



FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT
JENA



**RhoGTPasen in *Candida albicans* und deren Einfluss auf
das polarisierte Wachstum und
die Zytokinese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Alexander Dünkler
geboren am 27.11.1978 in Merseburg

Jena, Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. Die Pilze <i>Candida albicans</i> und <i>Ashbya gossypii</i>	3
2.2. Rho-GTPasen – zentrale Regulatoren	5
2.3. Chitinasen und ihre Wirkung auf die Zellwand	8
2.4. <i>MET3</i>-Promotor – ein regulierbarer Promotor	11
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1. Arbeiten mit <i>Candida albicans</i>	14
3.1.1. Stämme und Medien	14
3.1.2. Transformation von <i>C. albicans</i>	16
3.1.3. Isolierung von Total-RNA und cDNA- Synthese	16
3.2. Arbeiten mit <i>Ashbya gossypii</i>	17
3.2.1. Stämme und Medien	17
3.2.2. Sporenisolierung	17
3.2.3. Transformation durch Elektroporation	18
3.2.4. Mikromanipulation	19
3.2.5. Isolierung genomischer DNA	20
3.3. Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.3.1. Stämme und Medien	21
3.3.2. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	21
3.3.3. Plasmid-Präparation	22
3.4. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	23
3.4.1. Stämme und Medien	23
3.4.2. Transformation durch Elektroporation	23
3.4.3. Präparation von Plasmid-DNA	24
3.5. Arbeiten mit DNA	24
3.5.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
3.5.2. Agarosegelelektrophorese	29
3.5.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	29
3.5.4. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	29

3.5.5.	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	29
3.5.6.	Glätten überhängender DNA-Enden	30
3.5.7.	Ligation von DNA-Molekülen	30
3.5.8.	Sequenzierung	30
3.6.	Mikroskopie	33
3.6.1.	Aktinfärbung	33
3.6.2.	Chitinfärbung	34
3.6.3.	Mikroskopie mit Fluoreszenzproteinen	34
4.	ERGEBNISSE	35
4.1.	Die Rho-Typ GTPase kodierenden Gene <i>RHO3</i> und <i>RHO4</i> in <i>C. albicans</i> ..	35
4.1.1.	Proteinvergleich der GTPasen CaRho3 und CaRho4	35
4.1.2.	Identifizierung eines Introns in <i>CaRHO3</i>	38
4.1.3.	Die Deletion von <i>CaRHO3</i> führt zu einem Zellpolaritätsdefekt	39
4.1.4.	Das konstitutiv-aktive <i>ras1^{G13V}</i> -Allel kann den <i>rho3</i> -Phänotyp nicht supprimieren	44
4.1.5.	Die Deletion von <i>RHO4</i> in <i>C. albicans</i> führt zu Defekten bei der Zytokinese	45
4.1.6.	Der Zytokinesedefekt führt zu unterschiedlichen Kolonimorphologien bedingt durch die Selektionsmarkerwahl	48
4.1.7.	Hyphenbildung in <i>Carho4</i> -Mutanten	51
4.1.8.	Lokalisierung von CaRho4	52
4.1.9.	Komplementierung der <i>Carho4</i> -Defekte	54
4.1.10.	Überexpression von <i>CaENG1</i> hebt den Zytokinesedefekt in <i>rho4</i> -Mutanten auf ..	55
4.1.11.	Phänotypischer Vergleich zwischen <i>bnr1</i> und <i>rho4</i> Mutanten	58
4.1.12.	Lokalisierung von CaBnr1p in Hefe- und Hyphephase	59
4.2.	Die Chitinase <i>Cts2</i> in <i>A. gossypii</i>	61
4.2.1.	Proteinvergleich sporulations-spezifischer Chitinasen	61
4.2.2.	Deletion des <i>CTS2</i> -Gens in <i>A. gossypii</i>	65
4.2.3.	Wachstumsvergleich von <i>Agcts2</i> , Wildtyp und <i>Agleu2</i>	65
4.2.4.	<i>Agcts2</i> zeigt Unterschiede in der Sporenmorphologie	67
4.2.5.	<i>Agcts2</i> -Sporen zeigen keine Sensitivität gegenüber Zymolyase und Hitzeschock .	69
4.2.6.	Morphologischer Vergleich der Sporenkeimung	70
4.2.7.	<i>AgCTS2</i> wird während der Sporulation expremiert	72
4.2.8.	Komplementierung der <i>A. gossypii cts2</i> -Mutante durch <i>ScCTS2</i> und <i>CaCHT4</i>	74

4.2.9.	Deletionsmutanten von <i>CHT4</i> in <i>C. albicans</i> zeigen keine Defekte bei der Chlamydosporenbildung.....	77
4.3.	Regulation des <i>MET3</i>-Promotors in <i>A. gossypii</i> und <i>S. cerevisiae</i>	79
4.3.1.	Sequenzvergleich des <i>MET3</i> -Promotors von <i>A. gossypii</i> und <i>S. cerevisiae</i>	79
4.3.2.	Expressionsanalyse des <i>lacZ</i> -Gens unter Kontrolle des <i>AgMET3p</i> und <i>ScMET3p</i>	80
4.3.3.	Untersuchung der Regulierbarkeit des <i>AgMET3p</i> -GFP und <i>ScMET3p</i> -GFP durch Intensitätsmessungen	83
4.3.4.	Regulierbare Expression von <i>AgCYK1</i> durch den <i>AgMET3p</i>	86
4.3.5.	Regulierbare Expression von <i>AgWAL1</i> durch den <i>ScMET3p</i>	88
4.3.6.	<i>AgCBF1</i> komplementiert die Methionin-Auxotrophie einer <i>Sccbf1</i> -Mutante	90
5.	DISKUSSION.....	92
5.1.	Die GTPasen Rho3 und Rho4 sind in <i>C. albicans</i> am polarisierten Wachstum und an der Zytokinese beteiligt	92
5.1.1.	CaRho3 hat Funktionen bei der Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums .	93
5.1.2.	Ras1 induziertes Hyphenwachstum benötigt die GTPase Rho3	93
5.1.3.	Rho4 hat in <i>C. albicans</i> Funktionen bei der Zytokinese.....	94
5.1.4.	CaRho4 hat zwei voneinander unabhängige Funktionen.....	97
5.1.5.	CaRho4 und CaBnr1 lokalisieren an Septierungsstellen	97
5.2.	<i>AgCts2</i> - eine sporulations-spezifische Chitinase.....	99
5.2.1.	Cts2 ist am Aufbau der Sporenwand in <i>A. gossypii</i> beteiligt	100
5.2.2.	Die Cts2-Homologen haben konservierte Funktionen in verschiedenen Ascomyceten	101
5.3.	Regulierbare Expression durch den <i>AgMET3</i>-Promotor in <i>A. gossypii</i>	102
5.3.1.	Der <i>AgMET3p</i> in <i>S. cerevisiae</i>	103
6.	LITERATUR.....	105
6.1.	Fachliteratur.....	105
6.2.	Eigene Literatur	115
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116

1. ZUSAMMENFASSUNG

Kleine GTP-Bindeproteine der Rho-Familie sind zentrale Regulatoren der Morphogenese in eukaryotischen Zellen. In dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden bisher uncharakterisierten Rho-Proteine *RHO3* und *RHO4* in *C. albicans* untersucht. Nach dem Abschalten eines *CaMET3p* regulierten *RHO3*-Gens zeigten sich Zellpolaritätsdefekte und eine Depolarisierung des Aktinzytoskeletts in der Wachstumszone. Die Abschaltung des Promotors während der Hyphenphase führt zum Anschwellen der Hyphenspitzen. Das Ras1 induzierte Hyphenwachstum von *C. albicans* benötigt die GTPase Rho3. Die Deletion von *CaRHO4* führt zu elongierter Zellmorphologie und einem Zelltrennungsdefekt, der in kettenartigem Wachstum resultiert. *Carho4*-Mutanten weisen eine runzelige Kolonimorphologie auf. Diese ist auf den Zelltrennungsdefekt zurückzuführen und abhängig von der Wachstumsrate. Rho4 lokalisiert an den Septierungsstellen von Hefe- und Hyphenzellen. Das *C. albicans* Formin Bnr1 zeigt ein ähnliches Lokalisierungsmuster, was jedoch auf die Septierungsstelle von Seiten der Mutterzelle beschränkt bleibt. Die elongierte Zellmorphologie von *rho4*- und *bnr1*-Mutanten, legt eine Beteiligung an der Repolarisierung des Wachstums hin zur Septierungsstelle nahe. Durch die Überexpression der Endoglucanase *CaENG1*, nicht jedoch durch die Endochitinase *CaCHT3* konnte eine Supprimierung des Zelltrennungsdefekts von *Carho4* erreicht werden.

Chitinasen sind Enzyme, die für die Modellierung des Chitins in der Zellwand vegetativer Zellen und Sporen benötigt werden. Mit *AgCTS2* konnte nur eine Chitinase im Genom des filamentösen Ascomyceten *Ashbya gossypii* identifiziert werden, die ausschließlich während der Sporenbildung exprimiert wird. Durch die Deletion von *AgCTS2* kommt es zu morphologischen Defekten in der Sporenwand, die keine Auswirkung auf die Keimfähigkeit der Sporen nach verschiedenen Stressbedingungen hat. Die Expression der sporulations-spezifischen Chitinasen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* in der *Agcts2*-Mutante komplementiert den Sporenwanddefekt. Für *C. albicans* wurde bisher kein sexueller Zyklus beschrieben. *CaCht4* und *ScCts2* sind Funktionshomologe von *AgCts2*.

Die Deletion von *CHT4* in *C. albicans* hatte keinen mutanten Phänotypen, auch nicht bei der Chlamydosporenbildung.

Für die Funktionsanalyse einzelner Gene ist deren Fusion mit einem regulierbaren Promotor oft ein unerlässliches Hilfsmittel. Die Fusion des *MET3*-Promotors von *A. gossypii* mit verschiedenen Reportergenen und die Komplementierung einer *Agcyk1*-Mutante mit einem AgMET3p-AgCYK1 Konstrukt haben gezeigt, dass mit diesem Promotor eine regulierbare Expression in *A. gossypii* möglich ist. Zusätzlich besteht mit der heterologen Verwendung des *ScMET3*-Promotors eine zweite Möglichkeit zur regulierten Genexpression in *A. gossypii*. Die Komplementierung der Methionin-Auxotrophie einer *Sccbf1*-Mutante durch AgCbf1 hat gezeigt, dass dieses Protein wie das Homolog in Hefe an der Regulation der Methioninbiosynthese beteiligt ist.

2. EINLEITUNG

2.1. Die Pilze *Candida albicans* und *Ashbya gossypii*

Pilze sind eukaryotische Lebewesen, die phylogenetisch ein eigenständiges Reich innerhalb der Eukarya bilden. Sie unterscheiden sich von den Pflanzen durch ihre heterotrophe Lebensweise. Pilze besitzen im Gegensatz zu tierischen Zellen eine Zellwand, die Chitin als Stützsubstanz enthält. Die pflanzliche Zellwand besteht im Wesentlichen aus Cellulose. Eukaryoten grenzen sich gegenüber Prokaryoten durch den Besitz eines Zellkerns, das Vorhandensein von Organellen, die Verteilung des Genoms auf Chromosomen und die Translation durch 80S-Ribosomen ab. Gemeinsam mit Bakterien sind Pilze für die Zersetzung und das Recycling abgestorbener organischer Materie verantwortlich, wobei sie als einzige Organismengruppe in der Lage sind, Lignin des Holzes abzubauen. Pilze besiedeln die unterschiedlichsten Habitate und können in diesen als Saprophyten, Parasiten oder Symbionten auftreten. Aufgrund der kommerziellen Bedeutung von Pilzen in den verschiedensten Bereichen von Landwirtschaft, Nahrungsmittelindustrie, Biotechnologie und Medizin, sind sie eine der am intensivsten untersuchten Organismengruppe. Wir Menschen nutzen sie in vielerlei Hinsicht, etwa als Speisepilze oder in Biofermentatoren als Produzenten von Sekundärmetaboliten, Alkohol, Zitronensäure oder Vitamin C. Der wichtigste Vertreter bei der Produktion von Nahrungsmitteln wie Wein, Bier oder Teig ist *Saccharomyces cerevisiae*. Manche Vertreter zeichnen sich durch die Bildung von Sekundärmetaboliten aus, wie die Gattung *Penicillium*, dessen β -Lactame als Antibiotika bei Infektionskrankheiten von Bedeutung sind (BRAKHAGE, 1998)

Bei Pilzen sind zwei unterschiedliche Wachstumsformen zu beobachten. Manche Vertreter wie *S. cerevisiae* oder *Schizosaccharomyces pombe* wachsen als einzellige Hefen. Filamentös wachsende Pilze wie *Aspergillus nidulans* oder *Ashbya gossypii* bilden ein Myzel, aus vielzelligen, fadenförmigen Hyphen. Andere Arten wiederum zeigen beide Wachstumsformen und werden als dimorph bezeichnet. *Candida albicans* und *Ustilago maydis* wechseln zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum als Antwort auf

spezielle externe Umweltsignale, die durch komplexe Prozesse innerhalb der Zelle reguliert werden (WENDLAND 2001).

Von den weltweit circa 1,5 Millionen existierenden Pilzarten, sind lediglich 150 Arten für den Menschen pathogen. Die Zahl der humanen Pilzinfektionen ist in den letzten beiden Dekaden stark gestiegen, wobei die meisten Infektionen von *Candida*-Arten verursacht wurden und davon die überwiegende Mehrheit von *Candida albicans* (NGUYEN et al., 1996; TIRABOSCHI et al., 2000). Bei 71% der gesunden menschlichen Population können *Candida*-Spezies in der kommensalen Mikroflora von Mundhöhle, Verdauungs- und Vaginaltrakt nachgewiesen werden (ODDS, 1988; SOLL et al., 1991; RUHNKE, 2001). Durch eine Schwächung des Immunsystems infolge von HIV-Infektionen, Operationen, medikamentösen Behandlungen mit Immunsuppressiva oder einer Verminderung der bakteriellen Körperflora nach Antibiotikabehandlungen erhält *C. albicans* einen Wachstumsvorteil, der zur Ausbildung von Kandidosen auf der Oberfläche von Haut und Schleimhaut führen kann (STEINMETZ, 1999). Bei einer starken Immuninsuffizienz gelangt der Erreger in die Blutbahn des Menschen, breitet sich über das Gefäßsystem aus und befällt Organe und Gewebe. Bei der Etablierung dieser systemischen Kandidosen spielt der Wechsel von hefeartigem zum filamentösen Wachstum eine entscheidende Rolle, weil damit die Penetration der Epithelzellen durch das Pathogen ermöglicht wird. Neben dem morphologischen Wechsel spielen auch Adhäsine, welche die Bindung an das Wirtsgewebe vermitteln, Phospholipasen und alkalische Phosphatasen eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *C. albicans* (GALE et al., 1998; GOW et al., 2002; HUBE und NAGLIK, 2001). Das Umschalten von Hefe- zu Hyphenwachstum wird als einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren angesehen und ist durch Signaltransduktionswege reguliert. Die Transkriptionsfaktoren Efg1 und Cph1, die durch die cAMP- und MAP-Signalkaskade kontrolliert werden, induzieren das Hyphenwachstum. Eine Deletion dieser Transkriptionsfaktoren hat Defekte in der Hyphenbildung zur Folge, was in einer Avirulenz resultiert (LO et al., 1997; STOLDT et al., 1997). Generell korreliert bei *C. albicans*-Mutanten mit Hyphenbildungsdefekten der Phänotyp mit einer Avirulenz (LO et al., 1997). Wie der verwandte Ascomycet *S. cerevisiae* ist auch *C. albicans* ein diploider Organismus. Das haploide Genom von *C. albicans* verteilt sich auf 8 Chromosomen (1 bis 7 und R) und umfasst circa 8000 offene Leserahmen (ORFs). Eine Besonderheit dieses Pilzes ist die

Kodierung des Codons CUG für Serin statt für Leucin (SANTOS und TUIE, 1995). Mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms wurden Gene identifiziert, die für mögliche Elemente einer meiotischen Teilung kodieren (BRAUN et al., 2005; TZUNG et al., 2001). Ein vollständiger sexueller Reproduktionszyklus konnte bisher nicht nachgewiesen werden, obwohl mit *MTLa* und *MTLα*, Loci für unterschiedliche Kreuzungstypen vorhanden sind (HULL und JOHNSON, 1999). Bisher konnte lediglich die Kreuzung bei bestimmten *C. albicans*-Stämmen beobachtet werden (MAGEE und MAGEE, 2000; HULL et al., 2000; LOCKHART et al., 2003). Bei der Kreuzung von *C. albicans* kommt es zur Karyogamie, die sogar zwischen verschiedenen *Candida*-Spezies möglich ist (PUJOL et al., 2004). Der Nachweis einer erfolgreichen Meiose konnte bisher nicht erbracht werden.

A. gossypii ist ein weiterer Vertreter der Ascomycota, der trotz seines rein filamentösen Wachstums sehr eng mit *S. cerevisiae* verwandt ist. Er ist ein phytopathogener Pilz auf Baumwolle und Zitrusfrüchten (ASHBY und NOWELL, 1926). Die Infektion der Wirtspflanze erfolgt durch Sporen, die von Insekten verbreitet werden. Bei der Penetration des Pflanzengewebes werden keine besonderen Strukturen ausgebildet. Das Myzel von *A. gossypii* hat eine gelbe Farbe, die auf die großen Mengen des gebildeten Vitamins Riboflavin (Vitamin B₂) zurückzuführen ist (DEMAIN, 1972; KELLER et al., 1988; STAHMANN et al., 2000). Deshalb wird dieser Organismus zur industriellen Gewinnung von Riboflavin genutzt, was als Farb- und Nahrungsergänzungstoff verschiedensten Lebensmittel zugesetzt wird. Die Biosynthese des Vitamins steht im Zusammenhang mit der Sporenbildung (STAHMANN et al., 2001). Als „filamentöse Hefe“ ist *A. gossypii* ein besonders interessanter Forschungsorganismus, um Fragen des filamentösen und hefeartigen Wachstums zu untersuchen (WENDLAND und WALTHER, 2005).

2.2. Rho-GTPasen – zentrale Regulatoren

Kleine GTP-Bindeproteine (G-Proteine) konnten in allen Eukaryoten, von der Hefe bis zum Menschen, identifiziert werden und stellen eine Superfamilie dar. Derzeit sind über 100 verschiedene kleine G-Proteine bekannt, die aufgrund phylogenetischer Gemeinsamkeiten in fünf Familien unterteilt werden: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran. Alle diese G-Proteine besitzen eine Konsensussequenz für die Bindung von GTP oder GDP, sowie für die GTPase-Aktivität, die das gebundene GTP zu GDP und P_i hydrolysiert (BOURNE et al.,

1991; VALENCIA et al., 1991). Die Mitglieder der Ras-, Rho- und Rab-Familie besitzen C-terminale Sequenzen, die im Falle der Rho-GTPasen einer posttranslationalen Farnesylierung unterliegen und dadurch an die Membran binden können (GLOMSET und FARNSWORTH, 1994)

Die kleinen GTPasen liegen inaktiv in ihrer GDP-gebundenen Form im Zytosol der Zellen vor. Die Aktivierung der G-Proteine erfolgt durch den Austausch des GDP durch GTP unter Wirkung von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs). Aktivierte GTP-gebundene G-Proteine binden an Membranen und können dort auf Effektorproteine wirken. Durch die Hydrolyse des gebundenen GTP wird die GTPase inaktiviert, ein Prozess, der mit Hilfe von GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) katalysiert wird (ZIMAN et al., 1993; MADDEN und SNYDER, 1998; JOHNSON, 1999; BI et al., 2000).

Die G-Proteine der Ras-Familie sind hauptsächlich an der Regulation der Genexpression über die Proteinkinase A involviert. Ras1 und Ras2 Proteine in *S. cerevisiae* regulieren den cAMP-Spiegel der Zelle über die Adenylatcyclase in einer GTP-abhängigen Art und Weise (KATAOKA et al., 1984; BROEK et al., 1985). Die Mitglieder der Rab und Sar1/Arf Familie organisieren die intrazelluläre Vesikel-Verteilung und die G-Proteine der Ran-Familie sind in den Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma während der G1, S und G2-Phase des Zellzyklus, sowie in die Mikrotubuli-Organisation während der M-Phase involviert (TAKAI et al., 2001).

Die Rho-Familie mit Cdc42, Rho1, Rho2, Rho3, Rho4 und Rho5 in *S. cerevisiae* ist an den verschiedensten Aspekten der Zellpolarität beteiligt, sowie der Organisation der Septine (SIMON et al., 1995; HOLLY und BLUMER, 1999; GLADFELTER et al., 2002), der Regulation von Sekretion (ADAMO et al., 1999, 2001; GUO et al., 2001; ZHANG et al., 2001) und der Stimulation der Zellwandsynthese (CABIB et al., 1998). Alle Rho-Proteine besitzen Funktionen bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Cdc42 ist für die Polarisierung des Aktins während der Knospung verantwortlich (ADAMS et al., 1990; EVANGELISTA et al., 1997). Rho1 reguliert Aktinpolarisierung in einer besonderen Weise über die Proteinkinase C (Pkc1). In Folge von Zellwandstress ist Rho1 für die Depolarisierung des Aktins in der geschädigten Zelle verantwortlich. Die Repolarisierung des Aktins wird ebenfalls durch Rho1 über einen MAPK-abhängigen Prozess gesteuert (DELLEY und HALL, 1999). Die Überexpression von Rho2 kann die Aufgaben bei der Aktinpolarisierung von Rho1 ersetzen

und Rho5 wurde als negativer Regulator bei der Zellwandstress-abhängigen Depolarisierung des Aktins identifiziert (MARCOUX et al., 2000; SCHMITZ et al., 2002).

Die Rho-GTPasen Rho3 und Rho4 spielen wie Cdc42 eine wichtige Rolle beim polarisierten Wachstum. Ein Verlust der teilweise redundanten Rho3 und Rho4 Proteine, depolarisiert das Aktin und das Wachstum, wohingegen ein konstitutiv aktives Rho3 zur Hyperpolarisierung von Aktin führt (MATSUI und TOH-E, 1992; IMAI et al., 1996).

In Zwei-Hybrid Experimenten konnte gezeigt werden, dass verschiedene Rho-GTPasen mit den Forminen Bnr1 und Bni1 interagieren. Formine haben ihre Funktion bei der Aktinkabelsynthese (EVANGELISTA et al., 2002; PRUYNE et al., 2002, SAGOT et al., 2002a, b). Neben diesen linearen Aktinfilamenten gibt es die kortikalen Aktinpatches, die aus verzweigten Aktinfilamenten bestehen und vom Arp2/3-Komplex synthetisiert werden (WINTER et al., 1997). Die Formine besitzen am N-terminalen Ende eine G-Protein-Bindedomäne (GBD) und am C-Term eine Diaphanous-autoregulative Domäne (DAD), die bei einer intramolekularen Interaktion zu einer inaktiven Proteinkonformation führt (ALBERTS, 2001). Durch die Bindung einer aktivierten RhoGTPase an die GBD kann die inhibitorische Konformation aufgelöst und die Aktinsynthese durch das Formin aufgenommen werden (WASSERMANN, 1998; ALBERTS, 2001). In *S. cerevisiae* interagieren Cdc42, Rho1, Rho3 und Rho4 mit der GBD des Formins Bni1 (KOHNO et al., 1996; EVANGELISTA et al., 1997). Für Bnr1 konnte lediglich die Interaktion mit Rho4 gezeigt werden (IMAMURA et al., 1997). Bni1 lokalisiert zusammen mit Cdc42 an die Spitze der Zellen und ist an der Etablierung des polarisierten Wachstums beteiligt. Für die Funktion von Bni1 ist Cdc42 unerlässlich (OZAKI-KURODA et al., 2001; PRUYNE et al., 2004).

Der Morphologische Wechsel vom hefeartigem zum filamentösem Wachstum ist bei *C. albicans* einer der wichtigsten Virulenzfaktoren. Wie bei der Knospung ist auch bei der Ausbildung von Hyphen die Festlegung der Zellpolarität eine Voraussetzung für gerichtetes Wachstum (LO et al., 1997; WENDLAND und PHILIPPSEN, 2001). Während der Hyphenbildung bei *C. albicans* ist das Wachstum auf einen kleinen Bereich der Zelloberfläche begrenzt. Anfänglich erfolgt die Ausbildung von Keimschläuchen, der später zu langen Filamenten auswachsen. Für das Hyphenwachstum ist die Aufrechterhaltung der Zellpolarität an der Hyphenspitze unentbehrlich (HEATH und STEINBERG, 1999). Die Hefen von *C. albicans* und *S. cerevisiae* sind nur in der frühen

Phase der Knospenbildung auf polares Wachstum angewiesen, später erfolgt isotropes Wachstum (LEW und REED, 1995).

In *C. albicans* wurden GTP-Bindeproteine der Ras- und Rho-Familien als zentrale Regulatoren der Morphogenese identifiziert. Ras1 aktiviert über die cAMP- und MAPK-Signalkaskade Transkriptionsfaktoren, die für die Hyphenbildung verantwortlich sind (LEBERER et al., 2001). Die Expression eines dominant aktiven *RAS1* Allels (*ras1^{G13V}*) in *C. albicans* führt zu konstitutiver Hyphenbildung (FENG et al., 1999). Für die mit der Ras-Familie verwandte GTPase Rcr1 konnte gezeigt werden, dass sie Funktionen bei der Festlegung der Zellpolarität in der Hyphenphase hat (HAUSAUER et al., 2005). Die RhoGTPase Cdc42 ist für die Etablierung der Zellpolarität wichtig und hat Funktionen beim polarisierten Wachstum in der Hyphen- und Hefephase (USHINSKY et al., 2002; VAN DEN BERG et al. 2004). Cdc42 lokalisiert an die Spitze von Knospen und Hyphen, aber auch an Septierungsstellen. Diese RhoGTPase spielt eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts beim Übergang des polarisierten zum isotropen Wachstum in der Hefephase (HAZAN und LIU, 2002). Das *CaRHO4* Gen wurde in einem Experiment identifiziert, bei dem Gene von *C. albicans* isoliert wurden, die einen Einfluss auf die Pheromon-Antwort in *S. cerevisiae* zeigten. Es wurde als *CRL1* (*C. albicans* Rho-like protein1) bezeichnet (WHITEWAY et al., 1992). Die Deletion von *RHO4* in *A. gossypii* hat keine Auswirkungen auf das Wachstum oder die Morphologie der Hyphen (WENDLAND et al., 2000). In *Neurospora crassa* und *Schizosaccharomyces pombe* konnte jedoch gezeigt werden, dass diese RhoGTPase Funktionen bei der Septierung hat und eine Deletion des *SpRHO4*-Gens einen Zytokinesedefekt zur Folge hat (NAKANO et al., 2003; SANTOS et al., 2003; RASMUSSEN und GLASS, 2005).

In dieser Arbeit sollte die Analyse der Rho-GTPasen Rho3 und Rho4 in *C. albicans* durchgeführt werden und ihre Funktion aufgeklärt werden.

2.3. Chitinasen und ihre Wirkung auf die Zellwand

Die Abgrenzung von Zellen zum umgebenden Milieu oder zu benachbarten Zellen ist wichtig, um regulierend auf den Import und Export von Stoffen zu wirken. Alle Organismen besitzen eine Zellmembran, jedoch nur Pflanzen, Bakterien und Pilze bilden

zusätzlich eine Zellwand aus. Diese verleiht Stabilität und Schutz vor äußeren Einwirkungen und ermöglicht die Interaktion mit der Zellumgebung oder die Reaktion auf Umweltstimuli (GOODAY, 1995). Die Zellwand der Pilze ist eine komplexe Struktur, die meist aus Mannose-Proteinen, Chitin, β -1,3- und β -1,6 Glucan besteht, wobei die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten in den verschiedenen Pilz-Spezies variieren kann. An der Zelloberfläche ist eine Schicht aus Mannose-Proteinen ausgebildet, die einen Anteil von 40% an der Gesamtzellwand bei *S. cerevisiae* ausmacht und über β -1,6 Glucan mit der inneren Schicht verbunden ist (KOLLAR et al., 1997; KAPTEYN et al., 1999; DIJKGRAAF et al., 2002). Die innere bzw. die der Plasmamembran zugewandte Schicht der Zellwand besteht hauptsächlich aus Glucan und hat einen Anteil von 60% an der Zellwand. Das β -1,3 Glucan, das aus einer Kette von β -1,3 verbundenen Glucose-Monomeren besteht, verleiht der Zellwand seine Elastizität und dehnbare Festigkeit (KOLLAR et al., 1995; KLIS et al., 2002). In Zellwandextrakten wurde β -1,3 Glucan, als ein mit β -1,6 Glucan verzweigtes Polymer gefunden. Das β -1,6 Glucan ist durch kovalente Bindungen mit weiteren Zellwandkomponenten, wie dem Chitin verknüpft (KOLLAR et al., 1997; MRSA et al., 1997; DIJKGRAAF et al., 2002). In Gegensatz zu der Fibrillenstruktur von β -1,3 Glucan ist das β -1,6 Glucan-Polymer kürzer und amorpher in der Struktur und macht einen geringeren Anteil (12%) des Zellwandmaterials aus (MAGNELLI et al 2002). Chitin ist ein lineares Polymer aus β -1,6 verbundenen *N*-Acetylglucosamin-Monomeren, die im Unterschied zur β -D-Glucose am zweiten Kohlenstoffatom keine Hydroxylgruppe, sondern eine acetylierte Aminogruppe besitzen. Das Chitin bildet Mikrofibrillen, die durch Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisiert sind. Der Anteil des Chitins ist mit 1 bis 3% gering, was jedoch ausreicht, um als Stützelement zu fungieren (KRAMER und KOGA, 1986).

Die Komponenten der lateralen Zellwand sind jedoch auch an der Ausbildung des Septums beteiligt. Septen sind spezielle Zellwandstrukturen, die bei hefeartigem Wachstum eine entscheidende Rolle bei der Zelltrennung spielen und deshalb zwischen Mutter- und Tochterzellen lokalisiert sind. Ihre Synthese erfolgt in mehreren Schritten (CID et al., 1995; CABIB et al., 2001). Die Bildung eines Chitinringes am Septum dient der mechanischen Stabilität während der zeitlich begrenzten Verbindung der Zellen zum Zwecke der Mitose

(SLOAT und PRINGLE, 1978). Nach Abschluss von Mitose und der kompletten Ausbildung des Septums, wird das Chitin und Glucan an der Verbindungsstelle von der Tochterseite aus degradiert, damit sich die Tochterzelle von der Mutterzelle trennen kann. In *S. cerevisiae* wird bei diesem Prozess die Endochitinase Cts1 sekretiert, um die β 1,4-glycosidischen Bindungen zwischen den *N*-Acetylglucosaminen zu hydrolysieren (CORREA et al., 1982; KURANDA and ROBBINS, 1991). Der Trennungsprozess verläuft asymmetrisch. Cts1 wird durch den Transkriptionsfaktor Ace2 spezifisch in der Tochterzelle exprimiert und lokalisiert ausschließlich an der Tochterseite des Septums (FINLEY und BRENT, 1994; COLMAN-LERNER et al., 2001). Die Deletion der Glucanasen ScDse2 und ScDse4 (Eng1) resultiert in einem Zytokinesedefekt. Die Proteine lokalisieren an das Septum, wodurch eine Funktion dieser Glucanasen beim Abbau des β -1,3 Glucans am Septum wahrscheinlich ist (DOOLIN et al., 2001; COLMAN-LERNER et al., 2001; BALADRON et al., 2002; DE GROOT et al., 2003). Die β -1,3 Endoglucanase Eng1 in *C. albicans* hat analoge Funktionen zum ScEng1 (ESTEBAN et al., 2005). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* besitzt der humanpathogene Pilz *C. albicans* drei Chitinasen CaCht1, CaCht2 und CaCht3, die alle in ihrer Domänenstruktur dem ScCts1 ähnlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass CaCht3 das Funktionshomolog von ScCts1 ist (DÜNKLER et al., 2005). Neben diesen Endo- und Exochitinasen wurde eine vierte Chitinase identifiziert CaCht4. Diese weist Homologien zu ScCts2 aufweist, einer sporulation-spezifischen Chitinase (DÜNKLER et al., 2005).

Die Zellwand der Ascosporen von *S. cerevisiae* besitzt eine wesentlich komplexere Struktur, als die der vegetativen Zellen. Im Gegensatz zur zweischichtigen Zellwand von Hefezellen besteht die Sporenwand aus vier Schichten (SMITS et al., 2001). Die beiden inneren Schichten bestehen hauptsächlich aus Mannan und β -1,3 Glucan, jedoch ist in der Sporenwand das Mannan zur Plasmamembran hin lokalisiert und durchdringt die nach außen gerichtete Glucanschicht (KREGER-VAN RIJ, 1978). Die beiden äußeren Schichten sind spezifisch und nur in der Zellwand der Sporen zu finden. An die Außenseite des Glucans schließt sich eine Schicht aus Chitosan an (BRIZA et al., 1988). Während der Sporulation synthetisiert ScChs3 Chitin. Durch die sporulations-spezifischen Chitindeacetylasen Cda1 und Cda2, erfolgt die Umwandlung des Chitins in Chitosan durch

die Abspaltung der Acetylgruppen am zweiten Kohlenstoffatom des *N*-Acetylglucosamins. Der Umbau des Chitins zu Chitosan ist essentiell für die Organisation der äußeren Sporenwand (PAMMER et al., 1992; CHRISTODOULIDOU et al., 1996, 1999; MISHRA et al., 1997). Am Ende der Sporenwandsynthese wird die Chitosanschicht mit einer dünnen Dityrosin-Lage überzogen, die die Spore nach außen abgrenzt und ihr Resistenz gegenüber Umweltstress verleiht (BRIZA et al., 1994, 1996).

Die Rolle der sporulation-spezifischen Chitinase Cts2 in *S. cerevisiae* ist bisher nicht genau untersucht worden. Es konnte bisher gezeigt werden, dass sie Funktionen beim Reifungsprozess der Sporen hat (GIAVER et al., 2002). *C. albicans* besitzt mit Cht4 ein Homolog zum ScCts2. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Cht4 einen Einfluss auf die Chlamydosporenbildung in *C. albicans* hat. Chlamydosporen sind dickwandig und rund. Sie unterscheiden sich jedoch von den Ascosporen der Bäckerhefe, da es sich um asexuelle Sporen handelt (RUSTAD et al., 2006). Der filamentöse Ascomycet *A. gossypii* besitzt keine homologe Endochitinase zum ScCts1 oder CaCht3 (WALTHER und WENDLAND, 2005). Im Genom konnte lediglich die Chitinase AgCts2 identifiziert werden, deren Domänenstruktur auf eine sporulations-spezifische Funktion schließen lässt. Durch die Deletion von *AgCTS2* sollte dessen Funktion näher untersucht werden.

2.4. *MET3*-Promotor – ein regulierbarer Promotor

Eine der wichtigsten experimentellen Untersuchungsmethoden für die Funktionsanalyse von Genen ist die Deletion dieser und die anschließende Untersuchung des entstandenen Phänotyps. Diese Art der Funktionsanalyse ist jedoch nur möglich, wenn ein Gen bzw. dessen Genprodukt nicht essentiell für die Lebensfähigkeit eines Organismus ist. Um diese essentiellen Gene dennoch untersuchen zu können, stellt die Fusion des gewählten ORFs mit einem regulierbaren Promotor eine der am häufigsten angewandten Techniken dar.

In der Hefe *S. cerevisiae* werden verschiedenste Promotoren für eine regulierbare Genexpression verwendet, zum Beispiel die Promotoren der Gene *GAL1-10*. Diese Gene begleiten Funktionen im Metabolismus des Monosaccharids Galaktose. Die am häufigsten genutzten Promotoren von *GAL1* und *GAL3* können unter Verwendung von Galaktose als einzige Kohlenstoffquelle aktiviert werden und sind in Glucose-haltigem Nährmedium

inaktiv (BHAT et al., 1990, TIMSON et al., 2002). Ein weiterer regulierbarer Promotor ist der des *PHO5*-Gens, der über Phosphatmangel induziert werden kann (LENBURG und O'SHEA, 1996). Die Expression der an der Methioninbiosynthese beteiligten Gene *MET3* und *MET25* wird durch die Konzentration der Aminosäure Methionin im umgebenden Medium reguliert. Die Bildung der organischen Sulfat-Komponenten Methionin und Cystein erfolgt in *S. cerevisiae* in einem gemeinsamen Syntheseweg unter Beteiligung von *MET3* und *MET25*, sowie weiterer Gene. Das *MET3*-Gen kodiert für eine ATP-Sulfat-Adenyltransferase, die die Bildung von Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) aus anorganischem Sulfat und ATP katalysiert, dem ersten Schritt in der Synthese von anorganischem Sulfat (MARZLUF, 1997; THOMAS und SURDIN-KERJAN, 1997). Die Expression von *MET3* kann nicht nur durch die Zugabe von Methionin reprimiert werden, sondern auch durch S-Adenosylmethionin (AdoMet), das die stoffwechselaktive Form des Methionins darstellt (CHEREST et al., 1985; MOUNTAIN et al., 1991). Weshalb der wirkliche Repressor von *MET3* S-Adenosylmethionin ist. Es wird direkt aus Methionin durch die Wirkung von Sam1 und Sam2 synthetisiert. (THOMAS et al., 1989).

Für die Aktivierung verschiedener *MET*-Gene ist die Bindung von Cbf1 (Zentromer-Bindefaktor) nötig. Die Deletion von *CBF1* in *S. cerevisiae* hat Defekte bei der Chromosomenverteilung zur Folge und für das Wachstum dieses Stammes bedarf es der Zugabe von Methionin (CAI und DAVIS, 1990). In den Zentromerregionen der Chromosomen und in den Promotorbereichen von beispielsweise *MET3* und *MET25* wurden CDEI-Elemente (Centromer-DNA-Elemente I) identifiziert (HIETER et al., 1985; BAKER und MASISON, 1990; MELLOR et al., 1990). Diese CDEI-Elemente sind DNA-Abschnitte mit der Konsensussequenz CACRTG. In den Zentromerregionen bindet Cbf1 an diese Sequenzbereiche und ist an der Bildung des Kinetochors durch Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (HENNEMUTH und MARX, 2006). Im Promotorbereich von *MET3* bindet das Cbf1 als Homodimer an die CACRTG-Konsensussequenz und fungiert nach der Bindung von Met4 und Met28 als positiver Regulator für die Expression des nachfolgenden Gens bei Abwesenheit von Methionin (THOMAS et al., 1992, KURAS et al., 1996; BLAISEAU und THOMAS, 1998).

In *S. cerevisiae* ist die Repression von *MET3* durch Methionin ungewöhnlich stringent, was diesen Promotor zu einem viel genutzten Werkzeug für die Untersuchung essentieller Gene

gemacht hat (MOUNTAIN et al., 1991; STARK, 1998). Die Verwendung des *CaMET3*-Promotors in *C. albicans* als Werkzeug für die Funktionsanalyse von Genen ist ebenso etabliert wie in *S. cerevisiae*. Im Gegensatz zur Bäckerhefe ist für eine vollständige Reprimierung von *CaMET3* die Zugabe von Methionin und Cystein nötig (CARE et al., 1999). Neben dem *CaMET3*-Promotor wird auch der Promotor des *CaMAL2*-Gens für eine regulierbare Expression in *C. albicans* eingesetzt (GEBER et al., 1992; GOLLA et al., 2003)

In *A. gossypii* wird bisher der Promotor des *TEF1*-Gens für die Expression ausgewählter Gene verwendet. Dieser Promotor ist jedoch konstitutiv aktiv. Für die Untersuchung bestimmter Gene sind regulierbare Promotoren unerlässlich. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Funktionsweise des *MET3*-Promotors von *A. gossypii* und dessen Eignung als regulierbarer Promotor näher untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Arbeiten mit *Candida albicans*

3.1.1. Stämme und Medien

Candida albicans Wildtyp SC5314 (FONZI und IRWIN, 1993) und der für die Transformation verwendete Stamm BWP17 (*ura3::λimm434/ura3::λimm434, his1::hisG/his1::hisG, arg4::hisG/arg4::hisG*; WILSON et al., 1999) wurden in Vollmedium YPD (10g/l Hefeextrakt, 20g/l Casein Pepton, 20g/l Glucose) bei 30°C angezogen. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf Minimalmedium in Abhängigkeit des genutzten Selektionsmarkers. Als Minimalmedien wurden SD (20g/l Glucose, 5g/l Ammoniumsulfat, 1,7g/l Yeast Nitrogen Base, YNB, Difco) und alternativ CSM-Medium (20g/l Glucose, 5g/l Ammoniumsulfat, 1,7g/l YNB, 0,69g/l CSM) verwendet. Je nach Bedarf wurden den Minimalmedien Histidin (20mg/l), Arginin (20mg/l), Uridin (40mg/l) oder clonNAT (200µg/ml; Werner BioAgents) zugegeben.

Die Hyphenausbildung bei *C. albicans* kann von zahlreichen Faktoren ausgelöst werden. Für eine Hypheninduktion durch Zugabe von 10% Serum (Kälberserum, Sigma) und einer Temperaturerhöhung von 30°C auf 37°C wurden die Minimalmedien SD und CSM gewählt (GOW und GOODAY, 1982). Des Weiteren wurde der Hefe-Hyphe-Übergang in LEE's-Medium (12,5g/l Glucose, 5g/l Ammoniumsulfat, 0,2g/l Magnesiumsulfat, 3,28g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 0,5g/l Prolin, BUFFO et al., 1984) und Spider-Medium (10g/l Mannit, 16g/l Trypton, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l Natriumchlorid, 2g/l Dikaliumhydrogenphosphat; LIU et al., 1994) durchgeführt.

Regulierbare Gene die durch eine Fusion mit dem *CaMET3*- oder *CaMAL2*-Promotor entstanden, wurden im Falle des *CaMET3p* durch Zugabe von 3,5mM Methionin und Cystein in das Medium abgeschaltet. Zum Anschalten von *CaMAL2*-Promotor-regulierten Allelen wurden die betreffenden Stämme auf SM-Medium (20g/l Maltose; 5g/l Ammoniumsulfat; 1,7g/l Yeast Nitrogen Base, YNB, Difco) angezogen.

Für die Induktion der Chlamydosporenbildung, wurden die Stämme in YPD bei 30°C über Nacht inkubiert und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt und dreimal nacheinander 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 50µl der dritten Verdünnung auf Maismehlagar (17g/l Maismehlagar, BBL™; 0,33% Tween80) ausgebracht und unter einem Deckglas für 5 Tage bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Tabelle 1: Hergestellte und verwendete *C. albicans*-Stämme.

Stamm *	Genotyp	Herkunft
SC5314	<i>C. albicans</i> Wildtyp	GILLUM et al., (1984)
BWP17	<i>ura3::λimm34/ura3::imm34, his1::hisG/his1::hisG, arg4::hisG/arg4::hisG</i>	WILSON et al., (1999)
GC19	<i>bnr1::URA3/bnr1::HIS1, arg4</i>	MARTIN et al., (2005)
CAA3	<i>cht3::URA3/cht3::HIS1, arg4</i>	DÜNKLER et al., (2005)
CAA3MX	<i>cht3::ARG4/cht3::HIS1, ura3</i>	diese Arbeit
CAA9	<i>cht2::HIS1/cht2::URA3, arg4</i>	DÜNKLER et al., (2005)
CAA13	<i>cht1::URA3/cht1::HIS1, arg4</i>	DÜNKLER et al., (2005)
CAA29	<i>cht4::HIS1/cht4::URA3, arg4</i>	DÜNKLER et al., (2005)
CAA34	<i>rho4::HIS1/ RHO4, ura3, arg4</i>	diese Arbeit
CAA35	<i>rho4::ARG4/ RHO4, ura3, his1</i>	diese Arbeit
CAA41	<i>rho3::URA3/ RHO3, his1, arg4</i>	diese Arbeit
CAA43	<i>rho3::ARG4/ RHO3, ura3, his1</i>	diese Arbeit
CAA49	<i>rho4::HIS1/rho4::ARG4, ura3</i>	diese Arbeit
CAA50	<i>rho3::URA3/HIS1-MET3p-RHO3, arg4</i>	diese Arbeit
CAA51	<i>rho3::ARG4/HIS1-MET3p-RHO3, ura3</i>	diese Arbeit
CAA57	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3, his1</i>	diese Arbeit
CAA57MX	<i>rho4::ARG4/rho4::HIS1, ura3</i>	diese Arbeit
CAA58	<i>rho4::ARG4/rho4:: SAT1, ura3, his1</i>	diese Arbeit
CAA58MX	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3, his1</i>	diese Arbeit
CAA61	<i>rho4::ARG4/rho4::HIS1, leu2::URA3/LEU2</i>	diese Arbeit
CAA62	<i>cht3::ARG4/cht3::HIS1, leu2::URA3/ LEU2</i>	diese Arbeit
CAA63	<i>rho3::ARG4/HIS1-MET3p-RHO3, ade2::URA3-MAL2p-ras1^{G13V}/ADE2</i>	diese Arbeit
CAA64	<i>ade2::URA3-MAL2p-ras1^{G13V}/ADE2, his1, arg4</i>	diese Arbeit
CAA66	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3, HIS1-AgTEFpENG1/ENG1</i>	diese Arbeit
CAA67	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3, HIS1-AgTEFpCHT3/CHT3</i>	diese Arbeit
CAA69	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3, leu2::HIS1-MAL2p-GFP-RHO4/LEU2</i>	diese Arbeit
CAA74	<i>bnr1::URA3/bnr1::HIS1, leu2::SAT1-MAL2p-GFP-BNR1/LEU2, arg4</i>	diese Arbeit

* Alle hergestellten Stämme sind Derivate von BWP17.

3.1.2. Transformation von *C. albicans*

Für die Transformation von *C. albicans* wurden Disruptions- und Fusionskassetten durch PCR von pFA-Plasmiden amplifiziert. Die dafür verwendeten S1 und S2 Oligonukleotidprimer sind chimäre Primer, die am 5'-Ende eine 100bp Homologieregion zum Zielgen aufweisen und am 3'-Ende 20bp Homologie zum pFA-Plasmid besitzen (Tabelle 5; GOLA et al., 2003; SCHAUB et al., 2006). Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden entweder durch die Lithiumacetat-Methode (WALTHER und WENDLAND et al., 2003) oder mittels Elektroporation (KÖHLER et al., 1997) in die entsprechenden Stämme transformiert. Für die Transformation wurden jeweils 10µl gefälltes und gewaschenes PCR-Produkt mit der Zellsuspension gemischt und bei Anwendung der Lithiumacetat-Methode einem Hitzeschock bei 44°C für 15 min ausgesetzt. Die Elektroporation erfolgte durch einem Strompuls von 1,8kV (200Ω, 25µF). Der Transformationsansatz wurde in 1ml SD-Medium aufgenommen und zu je 330µl auf Selektionsplatten ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen bei 30°C wurden Transformanten sichtbar.

Für jeden Deletionsstamm wurden mindestens 2 unabhängige Mutanten hergestellt. Zum Nachweis der korrekten genomischen Integration von Disruptions- und Fusionskassetten wurden mit dem Zellmaterial der Transformanten, Verifizierungs-PCRs durchgeführt.

3.1.3. Isolierung von Total-RNA und cDNA- Synthese

Zur Isolierung von Total-RNA wurden Zellen des Wildtypstammes SC5314 verwendet. Die Gewinnung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von Glasperlen (0,25-0,5mm Durchmesser, Roth) und Phenol und der anschließenden guten Durchmischung der Zellsuspension auf dem Vortex (HOFFMAN und WINSTON, 1987). Die Aufreinigung von Poly(A)+-RNA aus Total-RNA wurde durch Bindung an Oligo-dT-Säulen erreicht, die nach Angaben des Herstellers verwendet wurde (Oligotex; Qiagen; Hilden).

Die aufgereinigte Poly(A)+-RNA diente als Ausgangsmatrize für die Reverse Transkription, bei der die cDNA gewonnen wurde. Für die Einzelstrang-Synthese wurden SuperScript III und oligo-dT-Primer verwendet (Invitrogen; Karlsruhe).

3.2. Arbeiten mit *Ashbya gossypii*

3.2.1. Stämme und Medien

Alle Arbeiten mit *Ashbya gossypii* wurden mit dem Stamm *leu2* durchgeführt, dem das *LEU2*-Gen für die Biosynthese der Aminosäure Leucin fehlt (Tabelle 2). Die Kultivierung erfolgte in AFM-Medium (20g/l Glucose, 10g/l Casein-Pepton, 10g/l Hefeextrakt, 1g/l Myo-Inositol) und CSM-Medium (20g/l Glucose, 0,3g/l Myo-Inositol, 0,69g/l CSM, 1g/l Asparagin-Monohydrat, 1g/l YNB ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat). Für die Selektion von Transformanten wurde CSM-Leu Medium und mit G418 (200µg/ml) oder clonNAT (400µg/ml) versetztes AFM-Medium verwendet.

Die Regulation der Promotoren *AgMET3p* und *ScMET3p* in *A. gossypii* erfolgte in 2xCSM-Medium mit oder ohne Zugabe von 2mM Methionin.

3.2.2. Sporenisolierung

Für die Gewinnung von Sporen wurde der entsprechende Stamm in einem Schikanekolben bei 30°C auf dem Schüttler mit 140U/min kultiviert. *A. gossypii* beginnt bereits nach wenigen Tagen in Minimalmedium (CSM) zu sporulieren. Um eine möglichst große Menge Sporen zu isolieren, wurde die Kultur für mindestens 5 Tage inkubiert.

Nach dem Erreichen der gewünschten Sporendichte wurde die Kultur auf 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 10min bei 4.000U/min zentrifugiert, die Pellets in 10ml Wasser aufgenommen und vereinigt. Durch Zugabe von 1ml Zymolyase (20mg/ml) und einer Inkubation bei 37°C für 2h unter leichtem Schütteln, wird die Zellwand verdaut und zum Teil noch in Sporangien enthaltene Sporen werden freigesetzt. Die Sporenfreisetzung und der Verdau des Myzels wurden mikroskopisch überprüft. Durch Zentrifugieren für 10min bei 4000U/min konnten die Sporen pelletiert werden und in 10 bis 20ml Sporenpuffer (0,03% Triton X-100), je nach Sporenmenge, aufgenommen werden. Die Suspension wurde auf 1,5ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und zentrifugiert (30s, 7.500U/min). Das Sporenpellet wurde erneut in 500µl Sporenpuffer resuspendiert und durch Zugabe von 500µl 50%tigem Glycerin bei -80°C lagerungsfähig gemacht.

Tabelle 2: Hergestellte und verwendete *A. gossypii*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
ATCC10895	Wildtyp	Wendland
leu2	<i>leu2</i>	MOHR, PHILIPPSEN
AWE27	<i>leu2, thr4, cyk1::GEN3</i>	WENDLAND und PHILIPPSEN, 2002
AWE37	<i>wal1::GEN3</i>	WALTHER und WENDLAND, 2004
ADA2	<i>leu2</i> , pRS AgTEFp-lacZ	diese Arbeit
ADA3	<i>leu2</i> , pRS ScMET3p-lacZ	diese Arbeit
ADA4	<i>leu2</i> , pRS AgMET3p-lacZ	diese Arbeit
ADA7	<i>leu2</i> , pRS AgCTS2p-lacZ	diese Arbeit
ADA8	<i>leu2</i> , pRS AgTEFp-GFP	diese Arbeit
ADA9	<i>leu2</i> , pRS ScMET3p-GFP	diese Arbeit
ADA10	<i>leu2</i> , pRS AgMET3p-GFP	diese Arbeit
ADA11	<i>leu2</i> , pRS415-kanMX	diese Arbeit
ADA12	<i>wal1::GEN3</i> ; pRS415-NATMX3-ScMET3p-AgWAL1	diese Arbeit
ADA16	<i>leu2, cts2::NATMX2/CTS2</i>	diese Arbeit
ADA17	<i>leu2, cts2::NATMX2</i>	diese Arbeit
ADA18	<i>leu2, cts2::LEU2/CTS2</i>	diese Arbeit
ADA19	<i>leu2, cts2::LEU2</i>	diese Arbeit
ADA20	<i>leu2, thr4, cyk1::GEN3</i> ; pAgMET3p-AgCYK1-NATMX3	diese Arbeit
ADA22	<i>leu2, cts2::LEU2</i> ; pRS AgCTS2	diese Arbeit
ADA23	<i>leu2, cts2::LEU2</i> ; pRS AgTEFp-ScCTS2	diese Arbeit
ADA24	<i>leu2, cts2::LEU2</i> ; pRS AgCTS2p-ScCTS2	diese Arbeit
ADA25	<i>leu2, cts2::LEU2</i> ; pRS AgTEFp-CaCHT4	diese Arbeit
ADA26	<i>leu2, cts2::LEU2</i> ; pRS AgCTS2p-CaCHT4	diese Arbeit

3.2.3. Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation von *A. gossypii* wurden Sporen des ausgewählten Stammes in 200ml AFM-Medium zur Keimung für ca. 10h bei 140U/min und 30°C inkubiert. Die ausgekeimten Sporen wurden durch Vakuumfiltration gewonnen, mit 50ml Wasser gewaschen und in 40ml eines 50mM Kaliumphosphatpuffers (Stammlösung: 41,8ml 1M

K₂HPO₄, 8,2ml 1M KH₂PO₄; pH 7,5) aufgenommen. Um das Myzel für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen wurde 1ml DTT (1M Dithiothreitol) zugeben und der Ansatz bei 30°C unter leichtem Schütteln für 30min inkubiert. Durch Filtration wurden das Myzel gewonnen und in 20ml kaltem STM-Puffer (270mM Saccharose; 10mM TRIS/HCl, pH 7,5; 1mM MgCl₂) gewaschen, anschließend das Zellpellet in einem geringeren Volumen STM-Puffer resuspendiert, so dass eine dickflüssige Suspension vorlag (1ml STM-Puffer je 300µg Myzel).

Je Transformationsansatz wurden 120µl der Myzel-Suspension mit der zu transformierenden DNA (10-20µg DNA in maximal 30µl H₂O) gemischt, in eine eisgekühlte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 4mm pipettiert und bei 1,8kV, 200Ω 25µF elektroporiert. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz in 1ml AFM aufgenommen und für mindestens 3h bei 30°C inkubiert, um die Expression des Resistenzmarkers zu gewährleisten. Danach wurde das transformierte Myzel auf AFM-Platten, die mit G418 (200µg/ml) oder clonNAT (400µg/ml) versetzt waren, ausgebracht. Bei der Selektion durch den Auxotrophiemarker *LEU2* wurde das Myzel in CSM-Leu Medium aufgenommen und direkt nach der Transformation auf Selektionsplatten ausgebracht. Nach 2 bis 3 Tagen wurden Transformanten überimpft. Diese Myzelien enthielten neben transformierten Kernen auch Wildtypkerne, da *A. gossypii* ein vielkerniger Organismus ist. Aus diesen heterokaryotischen Kolonien wurden Sporen gewonnen, aus denen homokaryotische Transformanten erzeugt wurden.

3.2.4. Mikromanipulation

Die Mikromanipulation diente der Vereinzelung von Sporen. Da jede Spore nur einen Zellkern enthält, entstehen aus heterokaryotischen Transformanten Homokarien. Dazu wurden Sporen der durch PCR verifizierten Heterokarien über Nacht in Selektivmedium bei 30°C und 140U/min inkubiert. Unter selektiven Wachstumsbedingungen keimen nur diejenigen Sporen aus, die den entsprechenden Marker im Genom besitzen. Anschließend wurden die ausgekeimten Sporen auf die Hälfte einer Agarplatte ausgebracht. Mit einem PatchMan NP2 Mikromanipulator (Eppendorf) und einem Axiovert 40 CFL-Mikroskop

(Zeiss, Jena und Göttingen) wurden einzelne Sporen in eine Mikroglaskapillare gesaugt und auf der anderen Hälfte der Agar-Platte freigesetzt. Die vereinzelt Sporen waren nach 2 bis 3 Tagen zu Kolonien herangewachsen. Mit Hilfe der PCR konnte gezeigt werden, dass keine Wildtypallele mehr im Myzel vorhanden waren.

3.2.5. Isolierung genomischer DNA

Für die Verifizierung von *A. gossypii* Transformanten und zur Amplifizierung von Gen-Fragmenten durch PCR wurde genomische DNA aus den entsprechenden Stämmen isoliert.

Dafür wurden Flüssigkulturen verwendet, die für 2 Tage bei 30°C und 140U/min im Schikanekolben unter selektiven Bedingungen angezogen wurden. Zwei 1,5ml Reaktionsgefäße wurden mit der Kultur befüllt und für 10min bei 13.000U/min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 1ml H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10min, 13.000U/min) wurde das Myzel in jeweils 700µl STE-Puffer (1M Sorbitol, 50mM TRIS, 100mM EDTA) resuspendiert, 25µl Zymolyase (2,5µg/µl) und 25µl 10%tiges SDS zugegeben. Anschließend wurde die Myzelsuspension für mindestens 30min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 300µl P3-Puffer (2,55M Kaliumacetat) und der Ansatz wurde nach leichtem Schütteln für 15min auf Eis gestellt. Danach wurde das Gemisch abzentrifugiert für 10min bei 13.000U/min und der Überstand auf zwei neue 1,5ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und durch Zugabe eines Volumenteils Isopropanol die DNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde nach Zentrifugation (30min, 13.000U/min) mit 250µl 70%tigem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25µl H₂O aufgenommen. Nach Vereinigung des Inhalts der 4 Gefäße wurde die DNA mit dem GenEluteTM PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) gereinigt, um Proteinreste und RNA-Abbauprodukte zu entfernen.

3.3. Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1. Stämme und Medien

Für die Arbeiten mit *S. cerevisiae* wurde der diploide Stamm BY4743 (*his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, met15Δ0/MET15, LYS2/lys2Δ0*; Euroscarf) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C und 140U/min. In Vorbereitung auf die Transformation wurden die Zellen in YPD-Medium angezogen. Für die Selektion mit G418 oder clonNAT (je 200µg/ml) wurde ebenfalls YPD verwendet. Die Selektion durch den Auxotrophiemarker *LEU2* erfolgte in Minimalmedium CSM-Leu oder SD.

Für die Expression von Genen unter Kontrolle des *ScMET3p* oder *AgMET3p* wurden die Hefezellen in SD oder CSM-Medium ohne Methionin angezogen. Zum Abschalten der Promotoren wurde 2,5mM Methionin zur Kultur gegeben. Für eine *GAL1p* kontrollierte Expression wurde anstelle von Glucose in Kulturmedium Galaktose verwendet.

Zur Detektion der *lacZ*-Expression, wurden die Stämme auf Agarplatten getropft. Diese bestanden aus den Komponenten für SD- oder CSM-Medium und es wurden 8ml/l X-GAL (20mg/ml in *N,N*-Dimethylformamid) zugegeben. Zusätzlich wurde das Kulturmedium durch 260mM Na₂HPO₄ und 250mM NaH₂PO₄ gepuffert.

3.3.2. Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* BY4742 wurde nach der etablierten Lithiumacetat-Methode von Gietz et al. (1995) durchgeführt. Von den Transformationsansätzen wurden 25-100µl auf Selektionsplatten ausgebracht und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Bei der Selektion auf G418 oder clonNAT wurden die Zellen vor dem Ausplattieren in YPD aufgenommen und 3h bei 30°C ohne Selektionsdruck inkubiert, um die Expression des Resistenzgens zu gewährleisten.

Tabelle 3: Hergestellte und verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
BY4743	<i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, met15Δ0/MET15, LYS2/lys2Δ0; MATa/α</i>	Euroscarf
Y16858	BY4742; <i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; cbf1::kanMX4</i>	Euroscarf
YAD128	BY4743, pRS AgTEFp-lacZ	diese Arbeit
YAD129	BY4743, pRS AgMET3p-lacZ	diese Arbeit
YAD130	BY4743, pRS ScMET3p-lacZ	diese Arbeit
YAD131	BY4743, pRS AgTEFp-GFP	diese Arbeit
YAD132	BY4743, pRS AgMET3p-GFP	diese Arbeit
YAD133	BY4743, pRS ScMET3p-GFP	diese Arbeit
YAD146	BY4743, pRS415kanMX4	diese Arbeit
YAD148	Y16858, pRS NATMX5	diese Arbeit
YAD149	Y16858, pRS NATMX5 ScGAL1p-AgCBF1	diese Arbeit
YAD150	BY4742; pRS NATMX5	diese Arbeit

3.3.3. Plasmid-Präparation

Für die Isolierung von Plasmiden nach *in vivo*-Rekombination wurden die Stämme unter selektiven Bedingungen in 5ml Kulturmedium bei 30°C, 140U/min über Nacht angezogen. Das aus der Kultur durch Zentrifugation (30s, 13.000U/min) gewonnene Zellpellet wurde in 500µl 1M STE-Puffer (1M Sorbitol, 50mM TRIS, 100mM EDTA) resuspendiert und nach Zugabe von 15µl Zymolyase (2,5µg/µl) bei 37°C für 30min leicht geschüttelt. Im Anschluss wurden 50µl einer 10%tigen SDS-Lösung zugegeben und der Ansatz für 30min bei 65°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30min, nachdem der Ansatz mit 250µl 2,55M Kaliumacetat-Puffer versetzt wurde. Nach Zentrifugation (15min, 13.000U/min) wurde die DNA im Überstand mit einem Volumenanteil Isopropanol gefällt und für 30min bei 13.000U/min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%tigem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 100µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4. Arbeiten mit *Escherichia coli*

3.4.1. Stämme und Medien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, F⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ M15) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in 2YT-Medium (16g/l Trypton, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl). Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 100 μ g/ ml Ampicillin oder 100 μ g/ ml clonNAT.

3.4.2. Transformation durch Elektroporation

Vorbereitend für die Transformation von *E. coli*, wurden elektrokompente Zellen hergestellt. Dafür wurde eine 50ml Kultur mit *E. coli* DH5 α angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180U/min inkubiert. Mit 10ml dieser Kultur wurden 1000ml 2YT-Medium angeimpft und für ca.4h bei 37°C und 180U/min, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ im Bereich von 0,5 bis 0,8, inkubiert. Nach dem Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde der Kulturkolben für 15min auf Eis gekühlt und die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert (10min, 4000U/min, 4°C). Das Zellpellet wurde mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend in 20ml kaltem Glycerin (10%) resuspendiert und erneut zentrifugiert (15min, 4000U/min, 4°C). Nach der erneuten Aufnahme des Pellets in 5ml 10%-tigem Glycerin wurde die Zellsuspension aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt (DOWER et al., 1988; CALVIN und HANAWALT, 1988).

Für die Transformation wurden 50 μ l elektrokompente Zellen mit 5-10 μ l der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und luftblasenfrei auf den Boden eisgekühlter Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2mm pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5kV (200 Ω , 25 μ F). Unmittelbar nach dem Strompuls wurden die Zellen in 1ml 2YT- Medium aufgenommen und für 30min bei 37°C zur Expression des Resistenzmarkers inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.3. Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte durch alkalische Lyse (ISH-HOROWICZ und BURKE, 1981). Zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA für Kontrollrestriktionen wurden 4ml Selektivmedium (2YT +Ampicillin bzw. clonNAT) mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 U/min angezogen. Aus 1,5ml der Kultur wurden die Bakterien pelletiert und in 250µl P1-Puffer (50mM Glucose; 25mM TRIS, pH 8; 10mM EDTA) resuspendiert und nach Zugabe von 250µl P2-Puffer (200mM NaOH, 1% SDS), unter vorsichtigem Schütteln für 5min bei Raumtemperatur, lysiert. Die Neutralisation des Lysates erfolgte durch Zugabe von 250µl P3-Puffer (2,55M Kaliumacetat, pH 4,8), wodurch neben SDS-Proteinkomplexen auch höhermolekulare RNA- und DNA-Komplexe präzipitiert wurden, während zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung blieb. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13000U/min wurde der Überstand mit 750µl 2-Propanol versetzt und die gefällte DNA pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 250µl 70%-tigem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50µl Wasser aufgenommen und 6µl der DNA-Lösung für Restriktionsendonuklease-verdaus eingesetzt.

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAGEN MIDI Kit verwendet. Es wurden jeweils 50ml – Kulturen in Selektivmedium über Nacht bei 37°C angezogen. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen; Hilden).

3.5. Arbeiten mit DNA

3.5.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der PCR wurden Thermocycler der Reihe Primus advanced (peqlab Biotechnologie) verwendet. Die Reaktion erfolgte in Ansätzen von 50µl, die sich aus 5µl 10x PCR-Puffer (Genaxxon BioScience), 5µl Nukleinsäuregemisch (2mM je dNTP; (Genaxxon BioScience), jeweils 1,5µl Oligonukleotidprimer (10pmol; biomers, Ulm), 1µl bis 5µl Template-DNA und der entsprechenden Menge Wasser zusammensetzten. Zu jedem Reaktionsansatz wurde unmittelbar vor dem Start 0,5U Taq-DNA-Polymerase S (Genaxxon BioScience) gegeben.

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten von Plasmid-DNA, genomischer DNA oder Zellmaterial wurde ein Standard-Programm verwendet. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 2min. Beim Einsatz von Zellen als Template wurde die Denaturierung auf 5min erhöht. Darauf folgten 35 Zyklen mit je 1min 94°C Denaturierung, 1min 55°C Primeranlagerung und der Synthese für 1,5 bis 4min bei 72°C. Das Programm wurde durch einen abschließenden Syntheseschritt von 3min bei 72°C beendet. Die Synthesezeit in den Zyklen und die Temperatur während der Primeranlagerung variierte je nach Größe des gewünschten PCR-Fragments bzw. entsprechend der Schmelztemperatur der verwendeten Primer (Tabelle 4).

Die Amplifizierung der *C. albicans*-Transformationskassetten mit chimären Primern wurde durch ein Programm realisiert, bei dem die Temperatur für die Primeranlagerung während der ersten 10 Zyklen bei 45°C festgelegt war und bei den restlichen 25 Zyklen bei 55°C. Denaturierung und Synthese erfolgten wie beim Standardprogramm.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer

Primer	Primersequenz (5'→3')
<i>CaRHO3</i>	
S1-RHO3	CTTTAAGTGAACAACATTACACAACACGACAATTATCAACGAGTCA ACCTGTTCTGTCCTTTTCCAAAACCTTTCAAATCATTAAAAGTTATTTT GTCATTAgagcttcgtacgctgcaggtc
S2-RHO3	GCAGCTTCAGAAAATGCTTCGTTAACACCCTTGTTCTTCTTAGCAGA GCACTCCAAGTATCGTAAGGCCCACTTTCTTAGCCACAGCTAACC CTTCTTCGtctgatatcatcatgaattcgag
S2-METpRHO3	GTTAGTATTCCTGATCTAAGATTAGTCTAGTTATATATCTTGTTCTTA TCTTCTCCTTATTCTCAATACATACTTGTTTTTTGACCACCACCACAA AGAGGcatgttttctggggagggtatttac
G1-RHO3	CTTGGAGATGGTGCGTGTGG
G1v2-RHO3	CTCTTCCATCTATGTATCTTGAAG
G4-RHO3	GTGGTTCATTGTCATTGGCACC
I1-RHO3	GACAGGTTACGATCCTTGTC
I2-RHO3	CATAATGGTACAGCTGGATC
5'cog-RHO3	GAAAACTCTTCCATCTATGTATCTTG
3'cog-RHO3	GGAGGTCAAGTGAAAACTATTATAGATATGG
5'RHO3-cDNA	CCTTAAATATCATTAAAACATGCCTCTTTGTGG
<i>CaRHO4</i>	
S1-RHO4	AGATTTCTTACTGTAAATCTTAAGGATCTTCAATGATCTATCCCTAA CTTCAATTATAGTTCACAATACGCTATGATGAGCATCTTAACTATGTC AATATCgaagcttcgtacgctgcaggtc
S2-RHO4	CGGATAAGAAGGATAAACGAAACATTGACGATATATACAGCAAGTA ACCCAATATCACTCCAAAAGTACTACACTTTGACCAGTTAGATATCT CACTATActgatatcatcatgaattcgag

G1-RHO4	GAATCTGTAACGAATTGCCATG
G4-RHO4	CCCGATCGTATCTGTTAC
I1-RHO4	GACGGCAGTACAGTCGCC
I2-RHO4	CTGGAATGGTTCCCACTGC
atgRHO4 EcoRI	<u>ACGTgaattc</u> ATGACACCCAACGGCAGTAGGAG
3'RHO4 ClaI	<u>CGAACCcatcgat</u> CCAGTTAGATATCTCACTATAGG
<i>CaCHT3</i>	
S1-CHT3	GCTATCATTTATATCCGACCAACGTTCCCTAGATATCCTAGAAATTCT TATATTATACCTACCGCCTTTTTTACCTGCTTTTCCGGAATAATCAT AAGAgaagcttcgtacgtcgaggtc
S2-CHT3	CCACTGTACTTGGTTTCAGCAAAACTGTTTCAATATGTGTTCTAGTTG TCAATATTTGATAAGTCGTTGTAAAGGTGCGAAGAGTAGTTGGAGCC CATACTctgatatcatcgatgaattcgag
S2-TEFpCHT3	CCACCAGAGTTTTGTCCCCAATAAACAGCAACATTGGAGTTACTTCT AGCATTAATAGCTAAAGCAGGTAATAATAATGAAAATATAGTTAAC AAGTATAGCATgggtgtttatgttcggatgtgatgtg
G1-CHT3	CTTGGTTGTGTTTTTAAGGAC
G4-CHT3	CATACAGAATAGAACCGGGG
I1-CHT3	GAAAGAATCACAATATCAACAGCATCGG
I2-CHT3	GCCACTTCTACCACCAGTGCC
<i>CaCHT4</i>	
5'CaCHT4	GGTCAGCGGGATATCCGAAGG
3'CaCHT4	GAGTGTATTTGCCAGAATGG
5'CaCHT4 XhoI	<u>TATCCGctcgag</u> ATGTGTCATAAAATGATGAATAAAATTCC
3'CaCHT4 SacII	<u>TGATCCccgagg</u> GAGTGTATTTGCCAGAATGGATTC
<i>CaENG1</i>	
S1-ENG1	GCTTGTCATCACTGCTGGCTGGTACGGTCTATAGTAACTTAACTATTT ACTAAACCACATTATACTTAAAGAACATCAAATTGTAACCTATTGTTA ACAATGTCgaagcttcgtacgtcgaggtc
S2-TEFpENG1	TATGTGTAGTTTTAGTAACAGTAACGATTTCTTGATGAGCCAGGTTCT CTGCCAAAGCTTGAACGGCTATTAGTGTGCTAAGTAATACGGATTG AAAAGCATgggtgtttatgttcggatgtgatgtg
G1-ENG1	CGTCATTGATTCTGGTCTCTCTGATC
G4prom-ENG1	CGGTAAAGATGTAGCACTAAATACTG
<i>CaBNR1</i>	
atgBNR1-EcoRI	<u>CTACCGgaattc</u> ATGAACGAACCACCTCCCAAACG
3'BNR1-PvuII	<u>CTCGACcagctg</u> CTACTCAACGAGCGTATAGTTGGTC
<i>CaADE2</i>	
ADE2-down	GGTCGTATGATTGTTGAAGCAGCAC
ADE2-up	CCAGAGTTGTGAGGTCTTGGTGC
<i>CaRAS1</i>	
RAS1-intern	GGAAAGACAAGTTAGTTATCAAGATGG
<i>CaLEU2</i>	
G1-LEU2	CGGTACCGAAATTGTCAATG
G4v2 LEU2	CCACCTCGCAAGAAGTTGGACG
5-5 integ	<u>TCCccgagg</u> GGTGGTGCTGCCATTGATGCCAC
5-3 integ	<u>TGCtctaga</u> CTCCACAATCTCGACGATGCC
3-5 integ	<u>CCGctcgag</u> GAGCCTTGCCATGGGTCTGCTCC
3-3 integ	<u>CGGggtacc</u> CACACGTGACGAGTCAGCTG
3-3 LEU2 AatII Kpn I	<u>CGGggtaccgacgtc</u> CACACGTGACGAGTCAGCTGTTTC
3-3 LEU2v2 AatII KpnI	<u>CGGggtaccgacgtc</u> GACAACGAATTTGGAAACGAGCCCG

3-5 LEU2 HindIII	<u>CGACCCaagctt</u> GAGCCTTGCCATGGGTCTGCTCC
<i>CaARG4</i>	
A2	AATGGATCAGTGGCACCGGTG
A3	GGATATGTTGGCTACTGATTAGC
<i>CaHIS1</i>	
H2	CAACGAAATGGCCTCCCCTACCACAG
H3	GGACGAATTGAAGAAAGCTGGTGCAACCG
<i>CaURA3</i>	
U2	GTGTTACGAATCAATGGCACTACAGC
U3	GGAGTTGGATTAGATGATAAAGGTGATGG
<i>SAT1</i>	
T2	GCACACACTACTTAATATACACAGC
U3v3	GTGAAGTGTGAAGGGGGAG
5'SAT-BamHI	<u>CGCggaatcc</u> CGTCAAACTAGAGAATAATAAAGAAAACG
3'SAT-PmeI	<u>AGCTTTgtttaaac</u> GACCACCTTTGATTGTAAATAG
<i>CaMET3</i>	
MET3 primer	TCAAGTATACGTAATCTCCCC
<i>CaMAL2</i>	
5'MAL2p	TTTTGTCTAGTACCATCTGTACC
<i>AgCTS2</i>	
G1 AgCTS2	CCCGAGACATCCGAGTCCTCTCC
G4 AgCTS2	CGACTGGTACAAGAGGAGCTTGAC
5'AgCTS2	CGCATCTCTCTGTTCCCTCAGCC
3'AgCTS2	CCGGTAAAGCATGCTCCTAGC
5'AgCTS2p-KpnI	<u>TATCGGggtacc</u> CGCATCTCTCTGTTCCCTCAGCC
3'AgCTS2p-XhoI	<u>TATCCGctcgag</u> CCTCTTTAATCCCTTGCCAATTTG
I1 AgCTS2	CGATGGGATAGATCTTGACTGGG
I2 AgCTS2	GGACGCGCTGCACGTGCTGGACG
<i>AgMET3</i>	
5'AgMET3p-PmeI	<u>ATTAGGgtttaaac</u> GCGAAGTGAAGTCTCTGGAAGATAG
3'AgMET3p-SpeI	<u>TCATCCactagt</u> CATGTTGATCAATGTAGACTTCGTAC
5'AgMET3p-KpnI	<u>TATCGGggtacc</u> GCGAAGTGAAGTCTCTGGAAGATAG
3'AgMET3p-XhoI	<u>TATCCGctcgag</u> GTTGATCAATGTAGACTTCGTACACGC
<i>AgCYK1</i>	
S1-MET3p-CYK1	CGCCTGAATCCGATATCCAGATCAGATTGCGCTGCCTCCGCAACTGC AAAGaagcttcgtacgtgcaggtc
S2-AgMET3p-CYK1	CGACATAGCGGCTCTTTTCTTTCGTCGGAGAGTCCAGCTGAACCGTC ATgttgatcaatgtagacttcgtacacgc
CYK1-1	CTACAGAGAAATTCGTAGTACC
<i>AgWAL1</i>	
S1-MET3p-AgWAL1	CCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGC TCgaagcttcgtacgtgcaggtc
S2-ScMET3p-AgWAL1	GAATTGCCCGCTTAATCTTCTCCTTGTCTTCCGCCGTTAGAAGACCCA
Prom-up	Tgttaattatactttattctgttattattatac GTCTTCCGCCGTTAGAAGACCC
<i>AgCBF1</i>	
atg AgCBF1 XhoI	<u>TATCCGctcgag</u> ATGACGAAGAGACTACATGGAGAAC
3' AgCBF1 BglII	<u>CTCATGagatct</u> GTAGAGTTTCGATG

AgTEF1

5'AgTEFp-KpnI TATCGGggtaccGATCTGTTTAGCTTGCCTCGTCC
 3'AgTEFp-XhoI TATCCGctcgagGGTTGTTTATGTTCGGATGTGATGTG
 New#511 CCTCACAGACGCGTTGAATTG

ScCTS2

5'ScCTS2 CAGCATCTTGTTCAGTTGAC
 3'ScCTS2 CTGAGTTAGGTGTCTCCG
 5'ScCTS2-XhoI TATCCGctcgagATGGTAGGACACTCAGCTCAGCACAG
 3'ScCTS2-SacII TGATCCccgaggCTGAGTTAGGTGTCTCCGTAA
 I2 ScCTS2 GATGGCATTGATCTAGACTGGGAG

ScMET3

5'ScMET3p-PmeI ATTAGGgtttaaacGATATGTACGTAGTGGTATAAAGG
 3'ScMET3p-SpeI TCATCCactagtCATGTTAATTATACTTTATTCTTG
 5'-ScMET3p-KpnI TATCGGggtaccGATATGTACGTAGTGGTATAAAGG
 3'-ScMET3p-SalI GATACGCctcgacGTTAATTATACTTTATTCTTGTTAT

ScGAL1

5'ScGAL1p-KpnI TATCGGggtaccAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTACTTT
 3'ScGAL1p-XhoI TGATCCccgaggTATAAGATCCGGGGTTTTTCTCC

ScLEU2

Leu2ver1 GAACCTTAATGGCTTCGGCTG
 Leu2ver3 GTAAGGCCATTGAAGATGCAG

GEN3

G2new GCCAGTTTAGTCTGACCATC
 G3new TCGCAGACCGATAACCAGG
 S1 GEN3-pRS CGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGg
 atctggtgtatttaccataatgtt
 S2 GEN3-pRS CTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTGg
 atgaggccgtctttgtgatagcagc

NATMX

N2new GCGTTTCCCTGCTCGCAGGTC
 SL3 CACCGCCCTGTACGACGGCACC
 S1-ScLeu2p-NAT ACATTTTCAGCAATATATATATATATTTCAAGGATATACCATTCTAatgg
 gtaccactcttgacgacagggc
 S2-ScLeu2p-NAT CATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTtta
 ggggcagggcagctcatgtagagc
 S1-NATvskan GGAGTACTTGTTTTTAGAATATACGGTCAACGAACTATAATTAATA
 AACatgggaaccactcttgacgacagcgctaccgataccgaccagtgtccgggggagc
 S2-NATvskan CATAAAAATAAGAGGTATATAAAAATATTATATGGAAGCAATAATT
 ATTACTCttagggcagggcagctcatgtagagcgcc

GFP(S65T)

5'GFP(S65T)-SalI GACGCgtcgacATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC
 3'GFP(S65T)-SacII GTCCccgaggTATGCGTCCATCTTTACAGTCCTGTC

StlacZ

5'lacZ GTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC

pSK+, pDrive, pRS

M13 uni CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG
 M13 rev CACACAGGAAACAGCTATGACC

Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die kleingedruckten Buchstaben bei den S-Primern zeigen die Homologieregionen zu den pFA-Plasmiden an. Unterstrichene Sequenzbereiche enthalten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

3.5.2. Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurden Agarosegele von 0,8-1,2% Agarose in 1xTAE-Puffer (20x TAE: 0,8M Tris-Acetat pH 8,3, 10mM EDTA) verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,5µg/ml) zum Agarosegel wurden die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die DNA-Ansätze wurden mit dem Beladungspuffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol, 0,2% Orange G, 50% Saccharose, 1mM EDTA) 5:1 vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als DNA-Größenstandard diente mit *Pst*I gespaltene DNA des Phagen Lambda (MBI Fermentas).

3.5.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um ein definiertes DNA-Fragment zu isolieren, erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung des DNA-Gemisches, dann wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und das gewünschte Fragment aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert.

3.5.4. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und hydrolysieren in diesen an definierten Stellen die Phosphodiesterbindung beider DNA-Stränge. Hierbei entstehen je nach Enzym 5'- oder 3'-Überhänge („sticky“) bzw. glatte („blunt“) Enden. Zur Restriktion von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs; Jena Bioscience) und entsprechende Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.5.5. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

DNA-Ligasen benötigen 3'OH- und 5'Phosphatgruppen an den Enden der DNA um sie miteinander zu verbinden. Durch Behandlung mit einer alkalischen Phosphatase können 5'Phosphatgruppen entfernt werden und so eine Religation von zuvor gespaltenen

Restriktionsschnittstellen verhindert werden. Unmittelbar vor einer Ligation wurde die Behandlung des linearisierten Vektors mit der CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase; New England Biolabs) vorgenommen.

3.5.6. Glätten überhängender DNA-Enden

Nach einer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen können 5'-Überhänge von DNA-Doppelsträngen mit Hilfe des bifunktionalen Klenow-Fragments der *E. coli* Polymerase I aufgefüllt (5'→3'-Polymeraseaktivität) und terminale 3' Überhänge auf Länge des komplementären Stranges abgedaut (3'→5'- Exonukleaseaktivität) werden (JACOBSEN et al., 1974). Für die sogenannte fill-in- oder blunting-Reaktion wurde 1µg der gespaltenen DNA mit 2,5U Klenow-Fragment (New England Biolabs), nach Zugabe von 100µM dNTPs, in 1x EcoPol-Puffer für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnminütiges Erhitzen auf 75°C und Zugabe von 2µl EDTA (0,5M EDTA; pH 7,5) gestoppt.

3.5.7. Ligation von DNA-Molekülen

Um einzelne DNA-Moleküle kovalent miteinander zu verbinden, wurde die T4-DNA-Ligase (Promega) verwendet. Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren wurde ein Stoffmengenverhältnis von (2-3):1 eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden für 15-60min bei Raumtemperatur inkubiert. Die erforderlichen Ionenbedingungen wurden durch die Puffer des Herstellers gewährleistet.

Nach der Ligation wurden die Ansätze direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

3.5.8. Sequenzierung

Die Sequenzierungen zur Überprüfung der konstruierten Plasmide wurde von MWG Biotech (Martinsried) durchgeführt.

Tabelle 5: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Plasmide

Nr.	Plasmid	Selektionsmarker	Herkunft
#200	pFA-CaURA3	<i>amp^R, CaURA3</i>	Gola et al., 2003
#201	pFA-CaARG4	<i>amp^R, CaARG4</i>	Gola et al., 2003
#202	pFA-CaHIS1	<i>amp^R, CaHIS1</i>	Gola et al., 2003
#231	pFA-CaHIS1-MET3p	<i>amp^R, CaHIS1</i>	Gola et al., 2003
#439	pFA-SAT1	<i>amp^R, SAT1</i>	Schaub et al., 2006
#595	pFA-CaHIS1-TEFp	<i>amp^R, CaHIS1</i>	Schaub et al., 2006
#558	pFA-CaHIS1-MAL2p-GFP(GA) ₆	<i>amp^R, CaHIS1</i>	Schaub et al., 2006
#518	pFA-ScLEU2	<i>amp^R, ScLEU2</i>	Wendland
#514	pFA-NATMX2	<i>amp^R, NATMX2</i>	Wendland
#619	pFA-NATMX3	<i>amp^R, NATMX3</i>	Wendland
#499	pFA-GEN3	<i>amp^R, GEN3</i>	Wendland
#675	pFA-GEN3-AgMET3p	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#676	pFA-GEN3-ScMET3p	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#262	pQF145.2	<i>amp^R, CaURA3</i>	Feng et al., 1999
#611	pAU22	<i>amp^R, CaURA3</i>	Uhl and Johnson, 2001
#186	pRS415	<i>amp^R, ScLEU2</i>	Sirkorski and Hieter, 1989
#381	pRS416	<i>amp^R, ScURA3</i>	Sirkorski and Hieter, 1989
#150	pRS415 kanMX4	<i>amp^R, ScLEU2, kanMX4</i>	Wendland
#173	pLEU2-CYK1-GFP	<i>amp^R, ScLEU2</i>	Wendland and Philippsen, 2002
#183	pRS415 AgWAL1	<i>amp^R, ScLEU2</i>	Walther and Wendland, 2004
	pDrive	<i>amp^R, kan^R</i>	Qiagen, Hilden
#120	pSK+	<i>amp^R</i>	Philippsen
#49	pT7T3α18	<i>amp^R</i>	Philippsen
#392	pCaRHO3	<i>amp^R, kan^R</i>	diese Arbeit
#425	pCaRHO3-cDNA	<i>amp^R, kan^R</i>	diese Arbeit
#853	pCaRHO4	<i>amp^R</i>	diese Arbeit
#647	pHIEa-CaURA3	<i>amp^R, CaURA3</i>	diese Arbeit
#854	pFA MAL2p-GFP(ga) ₆ -CaRHO4	<i>amp^R, CaHIS1</i>	diese Arbeit
#857	pHEIb MAL2p-GFP(ga) ₆ -CaRHO4	<i>amp^R, CaHIS1</i>	diese Arbeit

#871	pHIEc MAL2p-GFP(ga) ₆ -CaRHO4	<i>amp^R, SAT1</i>	diese Arbeit
#838	pCaBNR1	<i>amp^R</i>	diese Arbeit
#875	pHIEc-GFP(GA) ₆ -CaBNR1	<i>amp^R, SAT1</i>	diese Arbeit
#535	pAgCTS2	<i>amp^R, kan^R</i>	diese Arbeit
#775	pAgCTS2-NATMX2 disrupt-cass	<i>amp^R, kan^R, NATMX2</i>	diese Arbeit
#781	pAgCTS2-LEU2 disrupt-cass	<i>amp^R, kan^R, ScLEU2</i>	diese Arbeit
#846	pRS AgCTS2	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#533	pCaCHT4	<i>amp^R, kan^R</i>	diese Arbeit
#841	pRS AgCTS2p-CaCHT4	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#842	pRS AgTEFp-CaCHT4	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#534	pScCTS2	<i>amp^R, kan^R</i>	diese Arbeit
#843	pRS AgCTS2p-ScCTS2	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#844	pRS AgTEFp-ScCTS2	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#628	pRS416 AgTEFp-lacZ	<i>amp^R, ScURA3</i>	diese Arbeit
#651	pRS AgTEFp-lacZ	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#656	pRS AgCTS2p-lacZ	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#653	pRS AgMET3p-lacZ	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#652	pRS ScMET3p-lacZ	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#690	pRS AgTEFp-GFP	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#691	pRS AgMET3p-GFP	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#692	pRS ScMET3p-GFP	<i>amp^R, GEN3</i>	diese Arbeit
#880	pRS NATMX5 AgMET3p-AgCBF1	<i>amp^R, NATMX5</i>	diese Arbeit
#886	pRS NATMX5 ScGAL1p-AgCBF1	<i>amp^R, NATMX5</i>	diese Arbeit
#887	pRS NATMX5	<i>amp^R, NATMX5</i>	diese Arbeit
#749	pAgMET3p-AgCYK1-GEN3	<i>amp^R, ScLEU2, GEN3</i>	diese Arbeit
#766	pAgMET3p-AgCYK1-NATMX3	<i>amp^R, NATMX3</i>	diese Arbeit
#729	pRS415-GEN3-ScMET3p-AgWAL1	<i>amp^R, ScLEU2, GEN3</i>	diese Arbeit
#736	pRS415-NATMX3-ScMET3p-AgWAL1	<i>amp^R, ScLEU2, NATMX3</i>	diese Arbeit

3.6. Mikroskopie

Die Mikroskopie wurde an einem vollautomatisierten Zeiss Axioplan2 Imaging- oder einem Axio-Imager-Mikroskop (Zeiss, Jena und Göttingen) durchgeführt. Die Steuerung von Mikroskop, Fluoreszenz- und Transmissionslicht-Blenden, sowie der MicroMax1024 CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, USA) wurde durch die Software MetaMorph Version 4.6 realisiert (Molecular Devices, Downington, USA). Außerdem wurde mit dieser Software die Bearbeitung der Aufnahmen durchgeführt.

Für die Mikroskopie wurden die *C. albicans*- oder *A. gossypii*-Stämme für mehrere Stunden in YPD oder Minimalmedien (SD, CSM) kultiviert. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet oder es wurde 1ml in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 30s abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Wasser resuspendiert, 1,5µl der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben und mikroskopiert. Die Bilder wurden in einem Vergrößerungsbereich von 10x bis 250x aufgenommen.

3.6.1. Aktinfärbung

Die Färbung des Aktinzytoskeletts erfolgte mit Rhodamin-Phalloidin (20U/ml, Molecular Probes) und wurde nach einem Protokoll von Oberholzer et al. (2002) durchgeführt. Die Zellen der untersuchten *C. albicans*-Kulturen wurden mit Formaldehyd (Endkonzentration 3,7%) für 30min fixiert und mit 50mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde eine zweite Fixierung mit Formaldehyd (Endkonzentration 3,7%) für eine Stunde vorgenommen, erneut mit 50mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,6) gewaschen und die Zellen in diesem Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 0,1%) und einer Inkubationszeit von 30min, wurden die Zellen abzentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit 1x PBSII (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4). Das Zellpellet wurde final in 100µl 1x PBSII aufgenommen und mit 1µl Rhodamin-Phalloidin versetzt. Dieser Ansatz wurde im Dunkeln bei 4°C für mindestens 12h inkubiert und anschließend mikroskopiert. Um die gefärbten Aktinstrukturen sichtbar zumachen, wurde der TRITC-Filter des Mikroskops benutzt.

3.6.2. Chitinfärbung

Zur Färbung von Zellwand und Septen wurde der Farbstoff Calcofluor (1mg/ml) genutzt. Mit Hilfe von Calcofluor wurde das Chitin der Zelle sichtbar gemacht. Dafür wurden 100µl einer Kultur mit 1µl Farbstoff versetzt. Nach einer Inkubations von 15min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mikroskopiert.

3.6.3. Mikroskopie mit Fluoreszenzproteinen

Zur mikroskopischen Untersuchung von GFP-markierten Proteinen wurden die Zellen in Minimalmedium unter den gewünschten Bedingungen angezogen und anschließend mikroskopiert. Für die Visualisierung des GFP wurde das EGFP-oder das narrow-band-EGFP-Filterset benutzt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Die Rho-Typ GTPase kodierenden Gene *RHO3* und *RHO4* in *C. albicans*

4.1.1. Proteinvergleich der GTPasen CaRho3 und CaRho4

In der Genomsequenz von *Candida albicans* konnte ein Homolog zum *ScRHO3*-Gen identifiziert werden, das als ORF 19.3534 auf Chromosom 2 annotiert ist (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/index.html>). Das *CaRHO3*-Gen besitzt einen offenen Leserahmen von 724bp. Das Gen für die Rho-GTPase *ScRHO4* hat ein Homolog in *C. albicans* auf Chromosom 1 mit einer Länge von 1041bp. Dieses ist als ORF 19.3330 annotiert und wird als *CaCRL1* oder *CaRHO4* bezeichnet.

Ein Proteinvergleich von CaRho3 zeigt eine Aminosäureidentität von je 71% zu Rho3 in *Saccharomyces cerevisiae* und *Ashbya gossypii*, sowie von 65% und 64% zu *Neurospora crassa* und *Schizosaccharomyces pombe*. CaRho3 hat eine Länge von 210 Aminosäuren und ist kleiner als das ScRho3 mit 231aa. Die CaRho3 Aminosäuresequenz enthält alle charakteristischen Domänen von Rho-Proteinen. Rho-GTPasen zeichnen sich durch das Vorhandensein von GTP/GDP-Bindedomänen, einer Effektor-Bindedomäne und einer Membran-Lokalisierung-Domäne, der sogenannten CAAX-Box (C, Cystein; A, aliphatische; X, beliebige Aminosäure) aus (Abbildung 1). Ein Aligment von *C. albicans* und *S. cerevisiae* Rho-Proteinsequenzen zeigt, dass die Bereiche für die GTP-Bindung und Hydrolyse (Aminosäuren 5-20, 53-62, 154-160 im ScCdc42p), sowie die Effektor-Bindung (Aminosäure 26-50 im ScCdc42p) am stärksten konserviert sind (Abbildung 1). Wobei die Aminosäureidentitäten in diesen Bereichen zwischen ScCdc42 und CaCdc42, sowie zwischen ScRho3 und CaRho3 höher liegen als zwischen Cdc42 und Rho3 Proteinen. Bei ScCdc42 gehen N-terminal vier Aminosäuren der ersten GTP/GDP-Bindedomäne voraus, während es bei ScRho3 und CaRho3 17 bzw. 13 sind. Der C-terminale Bereich von Rho3 in *S. cerevisiae* und *C. albicans* ist mit je 17 Aminosäuren zwischen letzter GTP/GDP Bindedomäne und CAAX-Box etwas länger als beim ScCdc42 mit 11

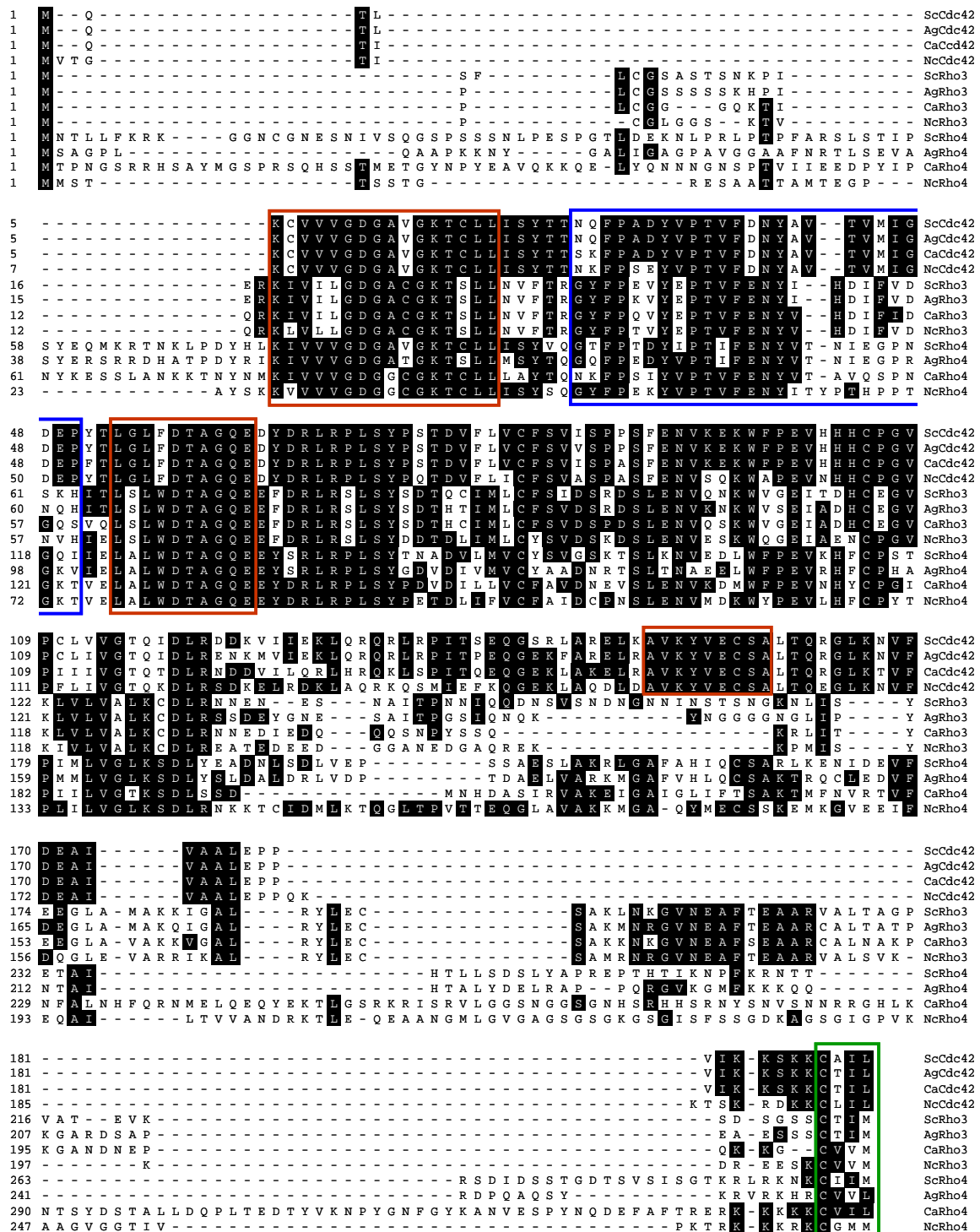


Abbildung 1: Aligment von Rho-Proteinen verschiedener Ascomyceten

Vergleich von Cdc42, Rho3 und Rho4 Proteinsequenzen der Ascomyceten *S. cerevisiae* (Sc), *A. gossypii* (Ag), *C. albicans* (Ca) und *N. crassa* (Nc). Die bekannten funktionellen Domänen in ScCdc42, die GTP/GDP-Bindedomänen (rote Boxen), Effektordomäne (blaue Box) und die Membran-Lokalisierung-Domäne mit dem CAAX-Motiv (grüne Box) wurden gekennzeichnet. Identische Aminosäuren sind schwarz markiert.

Aminosäuren, was in einer kürzeren Proteinsequenz von ScCdc42 und CaCdc42 (191 Aminosäuren) resultiert.

Rho4 von *C. albicans* konnte eindeutig zur Familie der Rho-GTPasen zugeordnet werden, da die Domänen für die GTP- und Effektor-Bindung, sowie die Membran-Lokalisierungs-Domäne konserviert sind (Abbildung 1). Die größte Aminosäureidentität des CaRho4-Proteins besteht mit 41% zum Rho4 von *S. pombe*, während es bei *S. cerevisiae*, *A. gossypii* und *N. crassa* 36% bis 35% sind. Die Rho4 Proteine der verschiedenen Ascomyceten zeigen eine weniger starke Konservierung als Cdc42 und Rho3-Proteine untereinander. Das CaRho4 zeichnet sich durch eine 76 Aminosäuren lange N-terminale Sequenz aus, die der GTP/GDP-Bindedomäne vorausgeht. Im ScRho4 hat dieser nicht konservierte N-Term eine Länge von 73 Aminosäuren. Das C-terminale Ende von Rho4 in *S. cerevisiae* und *C. albicans* besitzt ebenfalls nicht konservierte Sequenzbereiche. Dieser Bereich ist im CaRho4 mit 107 Aminosäuren mehr als doppelt so lang, wie beim ScRho4 mit 49 Aminosäuren. CaRho4 ist mit 346 Aminosäuren wesentlich länger als CaRho3, obwohl sich die Länge der konservierten GTPase spezifischen Domänen beider Proteine nicht wesentlich unterscheiden.

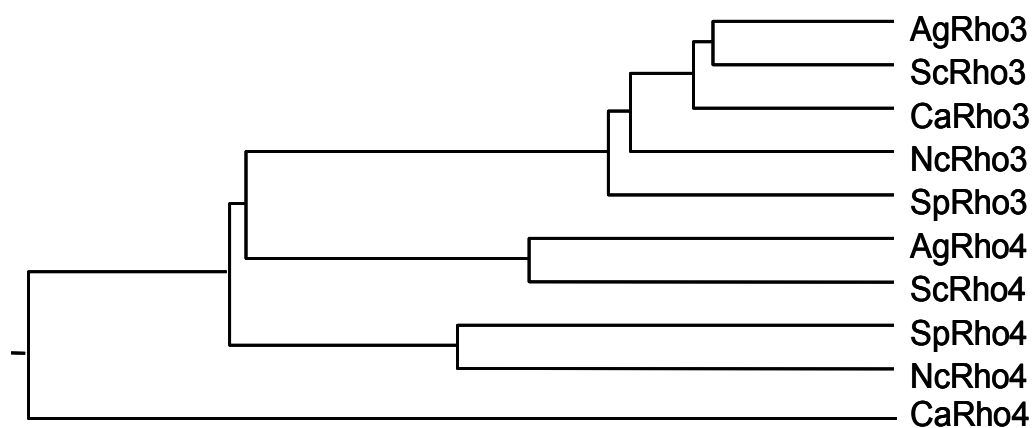


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum von Rho3 und Rho4 innerhalb der Ascomyceten

Der Stammbaum wurde aus den Proteinsequenzen der Rho-GTPasen von *S. cerevisiae* (Sc), *A. gossypii* (Ag), *C. albicans* (Ca), *N. crassa* (Nc) und *S. pombe* (Sp) mit Hilfe der DNASTAR-Software erstellt.

Beim Vergleich der beiden GTPasen Rho3 und Rho4 von *C. albicans* mit den homologen Proteinen anderer Ascomyceten in einem phylogenetischen Stammbaum, formieren sich mehrere Gruppen (Abbildung 2). CaRho3 ordnet sich um ScRho3 und AgRho3 innerhalb der Rho3-Gruppe an, da zwischen diesen GTPasen die größte Sequenzidentität besteht. Die Rho3-Proteine von *N. crassa* und *S. pombe* ordnen sich ebenfalls in diese Gruppe ein. Betrachtet man die Anordnung der Rho4-Homologen, so zeigt sich eine Gruppierung der Hemiascomyceten *S. cerevisiae* und *A. gossypii*, sowie der Archi- und Euascomyceten *N. crassa* und *S. pombe* miteinander. *C. albicans* gehört zu den Hemiascomyceten kann aber zu keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden.

4.1.2. Identifizierung eines Introns in *CaRHO3*

Die anfänglich erhaltene Sequenzinformation für *RHO3* aus der Genomdatenbank von *C. albicans* entsprach nicht der korrekten Sequenz, was auf Fehler bei der Sequenzierung des ORFs beruhte. Deshalb wurde mit den Primern 5'cogRHO3 und 3'cogRHO3 ein 1686bp großes Fragment von *CaRHO3* und den angrenzenden ORFs amplifiziert und in den Vektor pDrive kloniert. Nach der Sequenzierung von pCaRHO3 konnte das *RHO3*-Gen nur durch die Platzierung eines Introns im 5'Bereich des ORF eindeutig festgelegt werden (Abbildung 3, A; Tabelle 5). Um die Positionierung des Introns zu überprüfen, wurde cDNA hergestellt. Die Gewinnung erfolgte durch eine RT-PCR mit Oligo-dT-Primern aus isolierter mRNA des Wildtypstammes von *C. albicans*. Die erhaltene cDNA wurde zusammen mit den Primern 5'RHO3-cDNA und G4 RHO3 in einer PCR eingesetzt. Die Fragmentgröße des PCR-Produktes entsprach mit 626bp den Erwartungen (Abbildung 3, B). Zur Kontrolle diente genomischer DNA als Matrice der PCR. Das dabei erhaltene PCR-Fragment war mit 717bp um 91bp größer, was der Länge des prognostizierten Introns entsprach. Die Sequenzierung der klonierten cDNA von *CaRHO3* bestätigte die Intronpositionierung. Das Intron enthält Standard-Spleiß-Stellen am 5' und 3'-Ende, sowie die typische Lariat-Sequenz (Verzweigungsstelle) „TACTAAC“. Somit kodiert *CaRHO3* für ein Protein von 210 Aminosäuren, dass die typischen Sequenzmotive von Rho-GTPasen für die GTP-Bindung und die Membranlokalisierung enthält.

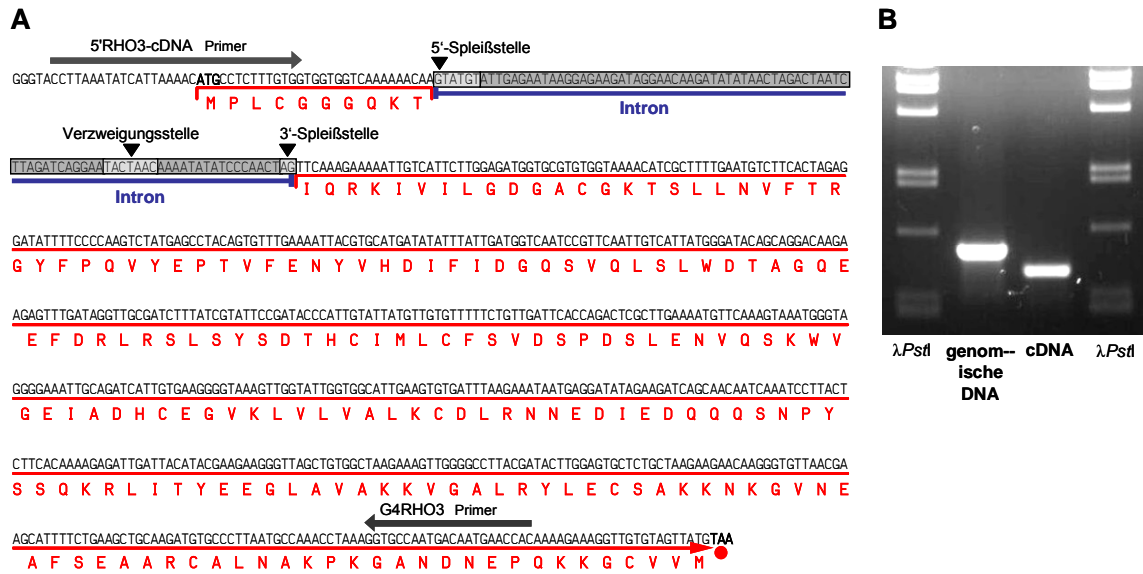


Abbildung 3: Intronposition im *CaRHO3*-Gen

Durch die Sequenzanalyse von *CaRHO3*-cDNA und genomischer DNA wurde ein 91bp großes Intron in *CaRHO3* identifiziert (grauer Balken, A) und die korrekte Proteinsequenz (rot, A) erstellt. Außerdem wurde das Intron durch eine PCR mit den Primern 5'RHO3-cDNA und G4 RHO3 mit verschiedenen Templates nachgewiesen (B).

4.1.3. Die Deletion von *CaRHO3* führt zu einem Zellpolaritätsdefekt

Für die Funktionsanalyse des *CaRHO3*-Gens sollte eine Deletionsmutante hergestellt werden. Es wurden homozygote *rho3/rho3*-Mutanten aus unabhängigen heterozygoten Mutanten erhalten, die nach der Transformation ein verlangsamtes Wachstum zeigten. Nach dem Überimpfen dieser Transformanten wurde eine veränderte, Wildtyp-ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet. Die Deletion beider *RHO3*-Allele konnte in diesen Mutanten nachgewiesen werden. Die mikroskopische Untersuchung zeigte keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp. Für die Analyse des *RHO3* Homolog in *S. cerevisiae* ist beschrieben, dass eine Deletion schwierig war und deshalb für die phänotypische Charakterisierung eine temperatur-sensitive Mutante hergestellt wurde (IMAI et al.; 1996; MATSUI und TOH-E, 1992). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass verschiedene *SRO*-Gene in der Lage sind den *RHO3*-Defekt zu supprimieren (MATSUI und TOH-E; 1992). Die Suppression durch *SRO*-Homologe könnte daher zu den phänotypischen Veränderungen der homozygoten *rho3*-Mutanten nach der Replikatlattierung geführt haben.

Um die Funktion des *CaRHO3* dennoch untersuchen zu können, wurde das verbleibende Allel in heterozygoten *rho3/RHO3* Mutanten unter die Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors von *C. albicans* gestellt. In den beiden unabhängig entstandenen Mutanten CAA50 und CAA51 war damit ein Abschalten der Expression von *RHO3* durch die Zugabe von Methionin und Cystein möglich (Tabelle 1). Die Kultivierung dieser Stämme erfolgte stets in SD-Medium, um die Expression des verbliebenen *RHO3*-Alleles durch den *CaMET3p* zu sichern.

Die Hefen des Wildtyp-Stammes SC5314 zeigen eine ellipsoide Gestalt mit einer Länge von 5,9µm und einer Breite von 4,3µm, die zu einem Länge-Breite-Index (LBI) von 1,36 führt (Tabelle 6, Abbildung 4). Nach Zugabe von 3,5mM Methionin und Cystein ins Kulturmedium verändert sich die Form der Hefezellen nicht. Der LBI liegt bei 1,35.

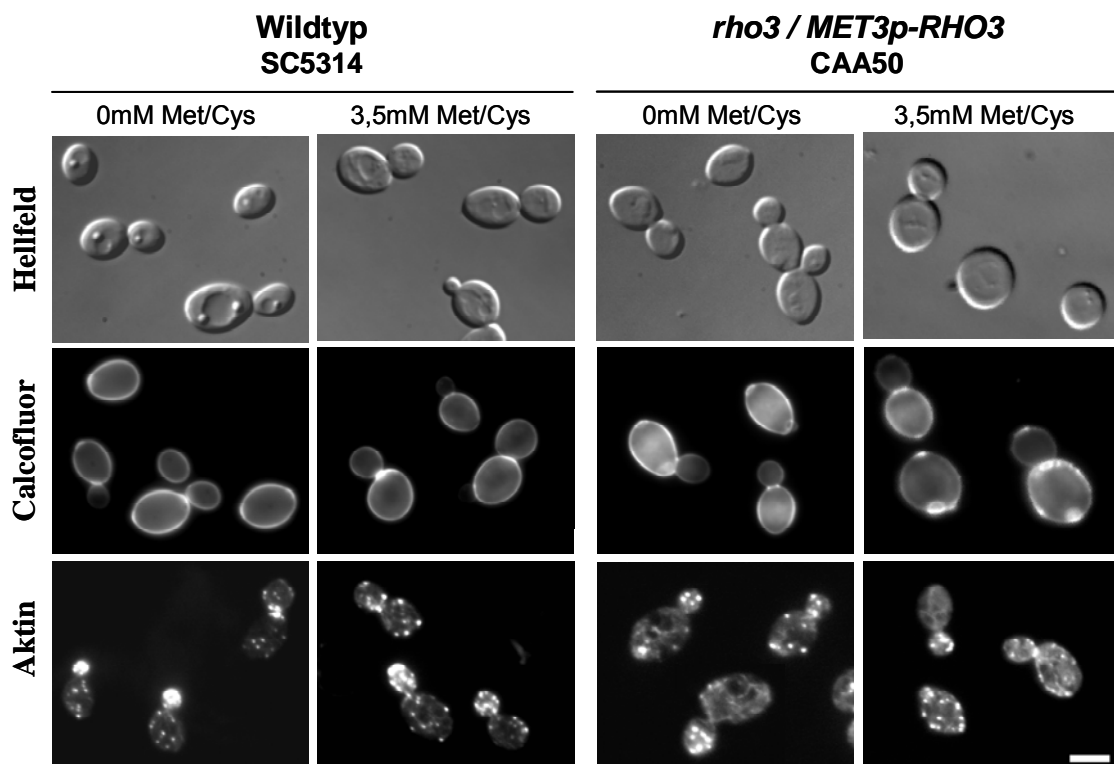


Abbildung 4: Wachstumsdefekt eines *rho3/MET3pRHO3* Stammes nach Abschaltung des Promotors

Die Zellen der Stämme SC5314 und CAA50 wurden in SD bei 30°C mit und ohne 3,5mM Methionin/Cystein kultiviert. Der Wildtyp zeigt oval geformte Hefen (linke Spalten). Nach der Abschaltung von *CaRHO3* sind runde Zellen zu beobachten (rechte Spalte). Die Färbungen mit Calcofluor und Rhodamin-Phalloidin zeigt die Verteilung von Chitin und des Aktinzytoskeletts. Größenbalken 5µm.

Tabelle 6: Vermessung der Hefezellen und Auszählung des Knospungsmusters von *rho3/MET3pRHO3*

		Wildtyp SC5314		<i>rho3/MET3p-RHO3</i> CAA50	
		0mM Met/Cys	3,5mM Met/Cys	0mM Met/Cys	3,5mM Met/Cys
Zell- gestalt	Länge in μm	5,89 \pm0,5	5,95 \pm0,6	6,02 \pm0,6	6,41 \pm0,7
	Breite in μm	4,33 \pm0,4	4,41 \pm0,4	4,26 \pm0,5	5,78 \pm0,6
	LB-Index	1,36	1,35	1,41	1,10
vermessene Zellen		132	155	221	251
Knospungs- muster	bipolar in %	66,9	60,5	65,1	57,4
	unipolar in %	31,7	37,1	32,8	39,1
	zufällig in %	1,4	2,4	2,1	3,5
gezählte Zellen		326	296	321	311

Die Hefen der Stämme SC5314 und CAA50 wurden in SD bei 30°C mit und ohne 3,5mM Methionin/Cystein angezogen und nach 6h mikroskopiert und vermessen. Für die Auszählung des Knospungsmusters wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt.

Nach Abschaltung der *RHO3*-Expression durch die Zugabe der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren, zeigen die Hefen der *rho3/MET3p-RHO3* Stämme eine runde Gestalt. Die Länge der Zellen von CAA50 beträgt durchschnittlich 6,4 μm und die Breite steigt auf 5,8 μm . Der LBI sinkt dadurch auf 1,1. Wird die Expression des *RHO3*-Allels gewährleistet, so sind ellipsoide Hefen zu beobachten, die auch im LBI von 1,41 dem des Wildtyps gleichen. Die Färbung von Zellen mit Calcofluor nach der Abschaltung der *RHO3*-Expression, zeigt eine gleichmäßige Verteilung des Chitins in der Zellwand und eine verstärkte Chitineinlagerung am Septum. Dies entspricht der Chitinverteilung in Hefezellen von SC5314. Bei der Analyse des Aktinzytoskeletts durch eine Rhodamin-Phalloidin Färbung im Wildtyp ist zu beobachten, dass sich verzweigte Aktinfilamente (Aktinpatches) immer an den Stellen des polaren Wachstums in der Spitze der entstehenden Tochterzelle befinden (Abbildung 4). Die Aktinpolymerisierung an einem Zellpol ist ein wesentlicher Prozess für die Ausbildung der Zellpolarität. Nach der Bildung eines Aktinringes und eines Septums zwischen Mutter- und Tochterzellen sind Aktinpatches gleichmäßig in der Tochter verteilt und führen zu isotropem Wachstum. Neben den Aktinpatches wurden auch lineare Aktinfilamente sichtbar gemacht, die Mutter- und Tochterzellen durchzogen. Unter abgeschalteten Bedingungen konnten im *rho3/MET3p-RHO3* Stamm verzweigte Aktinfilamente an den Stellen des polaren Wachstums beobachtet werden, die auch in

ihrer Verteilung denen des Wildtyps entsprachen (Abbildung 4). Des Weiteren wurde das Knospungsmusters, das durch die Zellpolarität mitbestimmt wird, in den Stämmen untersucht. Die Hefezellen des Wildtyps sind zu 67% bipolar und 32% zeigen Knospungsnarben an nur einem Pol (Tabelle 6). Die Zugabe von Methionin und Cystein verschiebt den Anteil der bipolaren Zellen nur geringfügig auf 61%. Die Abschaltung von *RHO3* im CAA50 Stamm führt bezüglich des Knospungsmusters zu keinen Veränderungen. Es wurden 57% bipolare und 39% unipolare Zellen ausgezählt. Der Anteil von Hefen mit einem zufälligen Knospungsmuster liegt zwischen 1% und 3,5 % (Tabelle 6).

Für die Untersuchung des Hyphenwachstums bei einer *RHO3*-Abschaltung des *rho3/MET3p-RHO3* Stammes, wurden die Zellen für 4h in SD-Medium mit 3,5mM Methionin und Cystein bei 30°C inkubiert und danach durch Zugabe von Serum und einer Temperaturerhöhung auf 37°C induziert. Dieser Induktionsprozess führte zur Ausbildung eines Keimschlauches und einem polarisierten Wachstum.

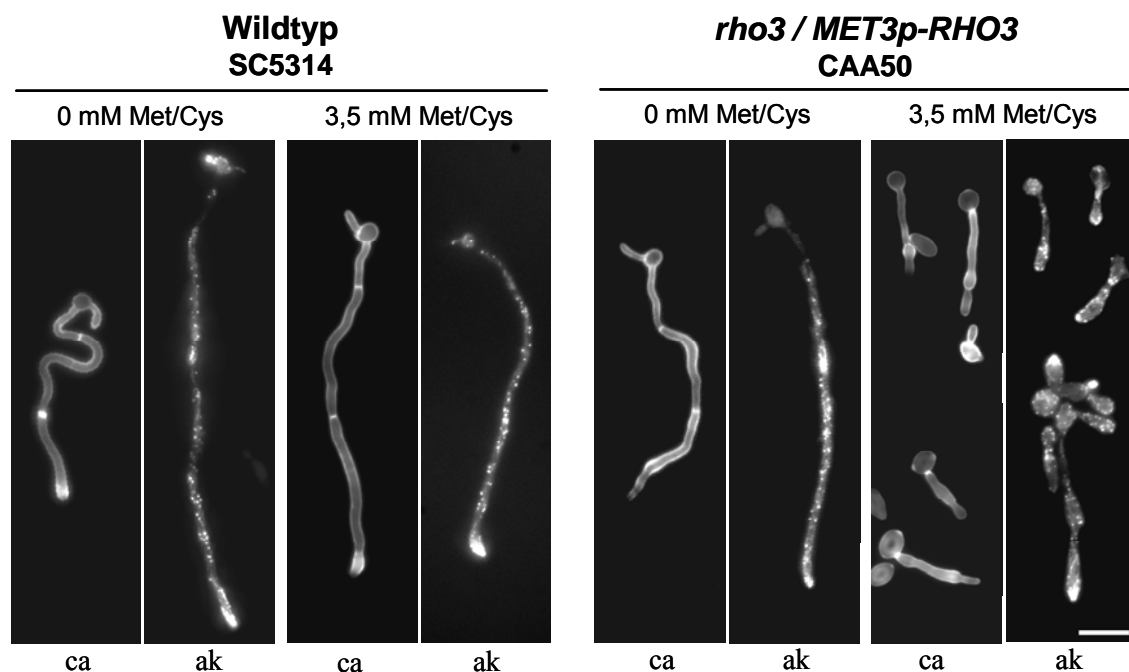
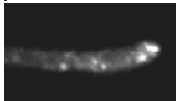
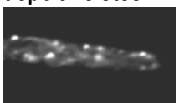


Abbildung 5: Hyphenwachstumsdefekte bei der Abschaltung von *CaRHO3*

Der Wildtyp zeigt nach 4h Seruminduktion und 37°C Inkubation gleichmäßig geformte Hyphen, mit einem polarisierten Aktinzytoskelett (rechte Spalten). In abgeschalteten *CaRHO3* Zellen kommt es zum Anschwellen der Hyphenspitzen, das Aktinzytoskelett ist in diesem Bereich depolarisiert. Die Calcofluor-Färbungen (ca) zeigen eine regelmäßige Septierung der Hyphen. Die Visualisierung des Aktins (ak) erfolgte durch Rhodamin-Phalloidin. Größenbalken 10µm.

Die meisten Hyphen zeigten nach der Bildung des ersten Septums anschwellende Hyphenspitzen und eine Beendigung des polarisierten Wachstums (Abbildung 5). Andere Hyphen schwellen bereits vor der Bildung des Septums im Bereich ihrer Wachstumszone an. Die Verdickung der Hyphenspitze des CAA50 Stammes unter Abschaltung des *MET3p* führt zu einer Depolarisierung der Aktinpatches in diesem Bereich. Diese verzweigten Aktinfilamente sind gleichmäßig verteilt, was ein Anschwellen bzw. isotropes Wachstum zur Folge hat. Einige der Rhodamin-Phalloidin gefärbten Hyphen in Abbildung 5 zeigen in ihren angeschwollenen Hyphenspitzen jedoch Aktinpatches, was auf eine bevorstehende Aufnahme des polarisierten Wachstums hindeutet. Unter den beschriebenen Bedingungen zeigen im *rho3/MET3p-RHO3* Stamm 46% der mikroskopisch untersuchten Hyphenspitzen depolarisierte Aktinpatches, der restliche Teil ist in der Wachstumszone polarisiert (Tabelle 7). Die Hyphen des Wildtyp-Stammes SC5314 haben bei Anwesenheit von Methionin und Cystein zu 95% polarisierte Aktinpatches, was morphologisch mit gleichmäßig schlank geformten Hyphen korreliert (Tabelle 7, Abbildung 5). Die Induktion des Wildtyps und des CAA50 Stammes mit 10% Serum in Abwesenheit der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren erzeugt ebenfalls gleichmäßig geformte Hyphen ohne Schwellungen. In über 90% der ausgezählten Hyphenspitzen sind polarisierte Aktinpatches zu beobachten.

Tabelle 7: Aktinverteilung in der Hyphenspitze nach Abschaltung von *CaRHO3*

	SC5314 Wildtyp		<i>rho3 / MET3p-RHO3</i> CAA50	
	0 mM Met/Cys	3,5 mM Met/Cys	0 mM Met/Cys	3,5 mM Met/Cys
polarisiertes Aktin 	97%	95%	93%	54%
depolarisiertes Aktin 	3%	5%	7%	46%
Gezählte Hyphenspitzen	100	106	111	106

Die Quantifizierung der Aktinpatchverteilung in der Hyphenspitze von SC5314 und CAA50 erfolgte durch eine Rhodamin-Phalloidin Färbung. Polarisierte Hyphen zeigen eine Konzentration der Aktinpatches an der Hyphenspitze.

4.1.4. Das konstitutiv-aktive *rasI*^{G13V}-Allel kann den *rho3*-Phänotyp nicht supprimieren

Die Abschaltung von *CaRHO3* führt in der Hyphenphase zu einem Anschwellen der Hyphenspitzen. Für den morphologischen Wechsel von der Hefeform zur Hyphe ist die Aktivierung der Ras1-GTPase nötig. In diesem Experiment soll gezeigt werden, ob durch ein konstitutiv-aktives *rasI*^{G13V}-Allel der *Carho3* Phänotyp aufgehoben werden kann. Das *rasI*^{G13V}-Allel wurde zu diesem Zweck in der *rho3/MET3p-RHO3* Mutante und in BWP17 in den *CaADE2*-ORF integriert (FENG et al.; 1999). Die Expression der konstitutiv-aktiven Ras1-GTPase wird durch den *CaMAL2*-Promotor reguliert, was einen Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Maltose bedingt. Die konstruierten Stämme CAA63 (*rho3/MET3p-RHO3*, *rasI*^{G13V}) und CAA64 (*rasI*^{G13V}) wurden auf ihre morphologischen Unterschiede während der Hyphenphase analysiert (Tabelle 1).

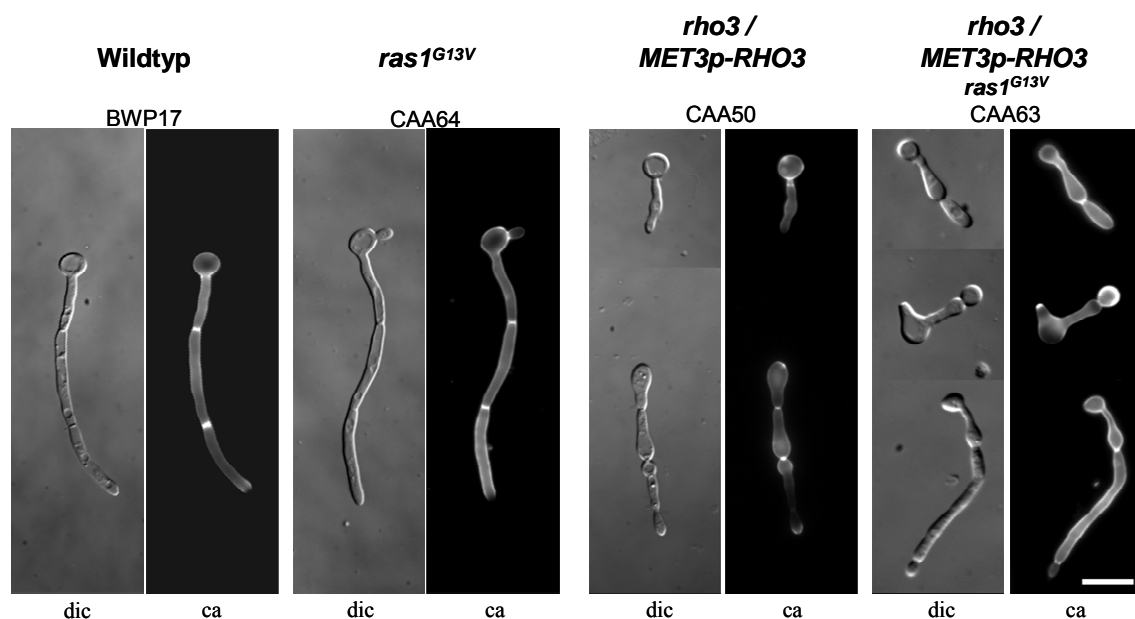


Abbildung 6: Expression von *rasI*^{G13V} nach der Reprimierung des *MET3pRHO3*-Allels

Die Abschaltung von *RHO3* und die konstitutiv-aktive *RAS1* (*rasI*^{G13V}) Expression resultieren nicht in der Aufhebung des Defekts in der Hyphenmorphogenese der *rho3*-Stämme. Die Kultivierung der Stämme erfolgte in Maltose-Flüssigmedium um die Expression von *rasI*^{G13V} zu gewährleisten und unter Zugabe von 3,5mM Methionin/Cystein zur Abschaltung von *RHO3*. Die Induktion der Hyphenbildung wurde durch 10% Serum und 37°C erreicht. Es sind Hellfeldbilder (dic) und Aufnahmen von Calcofluorfärbungen (ca) gezeigt. Größenbalken 10µm.

Unter induzierenden Bedingungen (10% Serum und 37°C) und Maltose als Kohlenstoffquelle sind BWP17 und CAA64 in der Lage Hyphen auszubilden (Abbildung 6). Die Überexpression von *RAS1* in CAA64 zeigt keine Unterschiede in der Gestalt zu BWP17, es wurden lange, schmale Hyphen in der für *C. albicans* typischen Form beobachtet. Die Überexpression von *CaRAS1* hat keine Auswirkungen auf die Morphologie der Hyphen. In Maltose-Medium, nach Zugabe von Serum und unter reprimierenden Bedingungen für den *MET3p*, zeigte die *rho3/MET3p-RHO3* Mutante mit dem *ras1*^{G13V}-Allel angeschwollene Hyphenspitzen (Abbildung 6). Dies ist identisch mit dem für die *rho3/MET3p-RHO3* Mutanten beschriebenen Phänotyp. Eine Aufhebung der Defekte in der Hyphenmorphogenese konnte durch die Überexpression von *CaRAS1* nicht erreicht werden.

4.1.5. Die Deletion von *RHO4* in *C. albicans* führt zu Defekten bei der Zytokinese

Für eine funktionelle Analyse von *RHO4* in *C. albicans*, erfolgte die komplette Deletion beider Allele. Zu Beginn wurden zwei heterozygote Mutanten mit den Auxotrophiemarkern *HIS1* und *ARG4* hergestellt. Diese dienten als Ausgangsstämme für eine weitere Transformation mit *ARG4* und *URA3*-Markern zur Deletion des jeweils verbliebenen *RHO4*-ORFs. Die entstandenen homozygoten Stämme *rho4::HIS1/rho4::ARG4* und *rho4::ARG4/rho4::URA3* wurden als CAA49 und CAA57 bezeichnet. Für die Untersuchung der *rho4*-Mutanten wurden diese in SD-Medium angezogen und mikroskopiert. Beim Vergleich der Hefezellen des Wildtyps SC5314 mit den *rho4*-Mutanten zeigten sich deutliche morphologische Unterschiede. Der Wildtyp zeichnete sich durch eine ovale Zellmorphologie aus. Es waren Einzelzellen und sich in Trennung befindliche Mutter- und Tochterzellen zu beobachten. Bei der Untersuchung der *rho4*-Mutanten war festzustellen, dass mehrere Hefen kettenförmig miteinander verbunden waren und keine Zelltrennung stattgefunden hatte. Es kam zur Ausbildung von Zellketten, die teilweise Verzweigungen aufwiesen (Abbildung 7). Die Färbung mit Calcofluor macht die Verteilung des Chitins innerhalb der Zellwand sichtbar und zeigt den erhöhten Chitingehalt an den Septen zwischen Mutter- und Tochterzellen. Die Ausbildung von Tochterzellen der zweiten Generation erfolgt nicht an der Geburtsnarbe, sondern am gegenüberliegenden Zellpol der Tochter aus erster

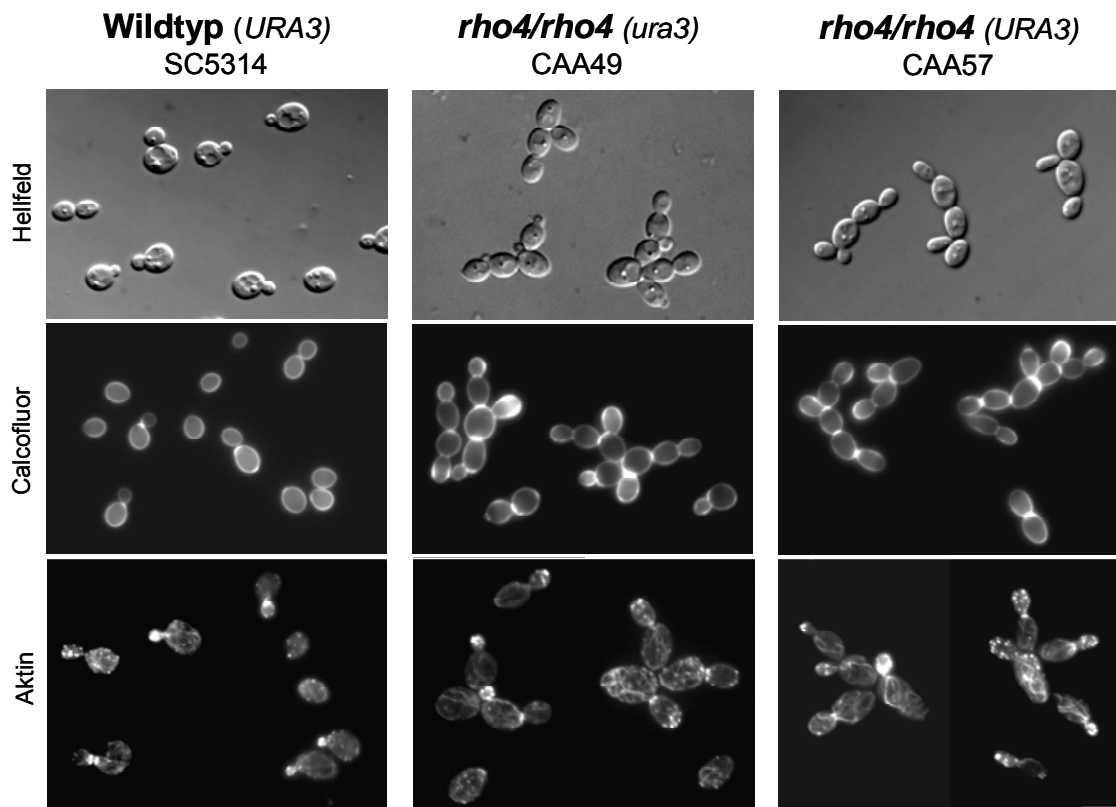
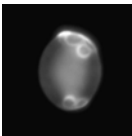
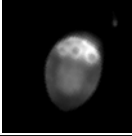
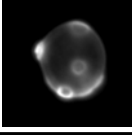


Abbildung 7: Zytokinesedefekte in *rho4*-Mutanten

Der Wildtyp-Stamm SC5314 und die beiden *rho4*-Mutanten CAA49 und CAA57 wurden in SD-Medium bei 30°C angezogen, mit Calcofluor und Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Die Deletion von *CaRHO4* führt zu einem Zellteilungsdefekt, der ein kettenartiges Wachstum zur Folge hat. Größenbalken 5µm.

Generation. Durch dieses Knospungsmuster und den Zytokinesedefekt kommt es zur Bildung von Zellketten. Die Verzweigungen dieser Ketten entstehen durch die ausschließliche Entwicklung weiterer Tochterzellen am zuvor genutzten Zellpol, obwohl eine Zellteilung zwischen Mutter und älterer Tochter nicht stattgefunden hat. Dieses monopolare Knospungsmuster führt zur Ausbildung von Zellketten und deren Verzweigung. Für die Untersuchung des Knospungsmusters wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt, wodurch die Knospungsnarben an den Zellpolen sichtbar gemacht und ausgezählt werden konnten. Für den Wildtyp SC5314 ergab sich ein Anteil von 67% der Hefen die ein bipolares Knospungsmuster zeigten, also beide Pole für die Ausbildung von Tochterzellen nutzten (Tabelle 8). Bei 32% der untersuchten Zellen wurde nur ein Zellpol für die Knospung benutzt. In den *rho4*-Stämmen sinkt der Anteil des bipolaren Knospungsmusters auf 24% bzw. 22% und es kommt zu einer Zunahme

Tabelle 8: Bestimmung des Knospungsmusters von *rho4*-Mutanten

Knospungsmuster		Wildtyp SC5314	<i>rho4/rho4</i> CAA49	<i>rho4/rho4</i> CAA57
bipolar		66,9%	24,0%	22,3%
unipolar		31,7%	68,8%	72,1%
zufällig		1,4%	7,2%	5,6%
gezählte Zellen		326	304	343

Die Hefezellen der Stämme SC5314, CAA49 und CAA57 wurden in SD-Medium bei 30°C angezogen und mit Calcofluor gefärbt. Die Verteilung der stärker gefärbten Knospungsnarben wurde ausgezählt.

des unipolaren Knospungsmusters auf 69% bzw. 72%, bei dem die Zellen nur einen Pol für die Bildung neuer Tochterzellen nutzen.

Die Färbung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin zeigte sowohl beim Wildtyp, als auch bei den *rho4*-Mutanten eine Anhäufung von Aktinpatches in der Spitze von entstehenden Tochterzellen (Abbildung 7). Nach Ausbildung eines Septums verteilen sich die Aktinpatches über die gesamte Tochterzelle und das polarisierte Wachstum geht in ein Isotropes über. Die linearen Aktinstränge sind während des Teilungsprozesses über die gesamte Zelle verteilt, was in den Mutterzellen am besten zu beobachten ist. Die Enden der meisten Aktinstränge zeigen eine Verbindung zum Septum hin. Unterschiede in der Verteilung von Aktinpatches und -strängen in den *rho4*-Mutanten und dem Wildtyp waren nicht zu beobachten.

Eine Vermessung der *rho4*-Mutanten in Länge und Breite zeigte Unterschiede in der Zellmorphologie auf. Die ellipsoide Form der Hefen des Wildtyps resultiert in einer durchschnittlichen Länge von 5,9µm und einer Breite von 4,3µm mit einem Länge-Breite-Index von 1,3 (Tabelle 9). Die Hefezellen von CAA49 und CAA57 waren mit 6,2µm und 6,3µm etwas länger als die des Wildtyps. In der Breite wurde für beide Stämme 4,0µm gemessen. Der Länge-Breite-Index beträgt 1,5. Durch die Deletion von *RHO4* in *C. albicans* kommt es in der Hefephase neben dem Zytokinesedefekt und der

daraus resultierenden Änderungen des Knospungsmusters auch zu einer Veränderung der Zellform. Die Hefezellen von *rho4*-Stämmen sind schlanker und länger als die des SC5314.

Tabelle 9: Länge und Breite von *Carho4*-Hefen

	Wildtyp SC5314	<i>rho4/rho4</i> CAA49	<i>rho4/rho4</i> CAA57
Länge in μm	5,89 \pm 0,5	6,22 \pm 0,7	6,31 \pm 0,7
Breite in μm	4,33 \pm 0,4	3,99 \pm 0,5	4,05 \pm 0,4
LBI	1,3	1,5	1,5
Anzahl vermessener Zellen	132	178	211

Zur Vermessung von Länge und Breite der Stämme SC5314, CAA49 und CAA57 wurden diese in SD-Medium bei 30°C angezogen und mit Calcofluor gefärbt. Die Länge und Breite wurden ins Verhältnis gesetzt und der Länge-Breite-Index (LBI) bestimmt.

4.1.6. Der Zytokinesedefekt führt zu unterschiedlichen Kolonimorphologien bedingt durch die Selektionsmarkerwahl

Für die Analyse von *CaRHO4* wurden Nullmutanten mit unterschiedlichen Markerkombinationen hergestellt. Dies führte beispielsweise zum Genotyp *rho4::ARG4/rho4::SAT1* für CAA58 und im Falle von CAA57 zu *rho4::ARG4/rho4::URA3*. Bei der Kultivierung dieser Stämme auf YPD-Agarplatten wurden unterschiedliche Kolonimorphologien festgestellt. CAA58 zeigte eine glatte und CAA57 eine gefurchte, runzelige Oberflächenstruktur, aber beide *rho4*-Mutanten haben in Flüssigkultur einen identischen Zellteilungsdefekt (Abbildung 8, Abbildung 7). Daraufhin wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von beiden Stämmen bestimmt. Die Verdopplungszeit von CAA58 betrug 108min, während bei CAA57 eine Generationszeit von 88min berechnet wurde (Tabelle 10). Die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme ist von der Markerkombination abhängig. Der Stamm CAA57 besitzt den *URA3*-Marker und wächst ähnlich schnell wie der Wildtyp SC5314. Fehlt *URA3*, dann verlangsamt sich das Wachstum und die Verdopplungszeit ist ähnlich der von BWP17, dem Ausgangsstamm aller Transformationen. Um diesen

Effekt besser zu untersuchen und die Abhängigkeit der Kolonimorphologie vom *URA3* zu demonstrieren, wurden die Selektionsmarker in den Stämmen ausgetauscht. Der *URA3*-Marker in CAA57 (*rho4::ARG4/rho4::URA3*) wurde gegen den *HIS1*-Marker getauscht und der *SAT1*-Marker in CAA58 (*rho4::ARG4/rho4::SAT1*) durch den *URA3* deletiert. Wie erwartet, wechselte die Kolonimorphologie und die Verdopplungszeiten stiegen bzw. sanken. Die *rho4*-Mutante (CAA58MX), die mit dem *URA3*-Marker transformiert wurde, zeigte nun eine runzelige Oberfläche und verringerte die Verdopplungszeit auf 92min. In dem Stamm, der *URA3* verloren hatte (CAA57MX) war eine glatte Kolonieoberfläche und ein langsames Wachstum zu beobachten (Abbildung 8, Tabelle 10).

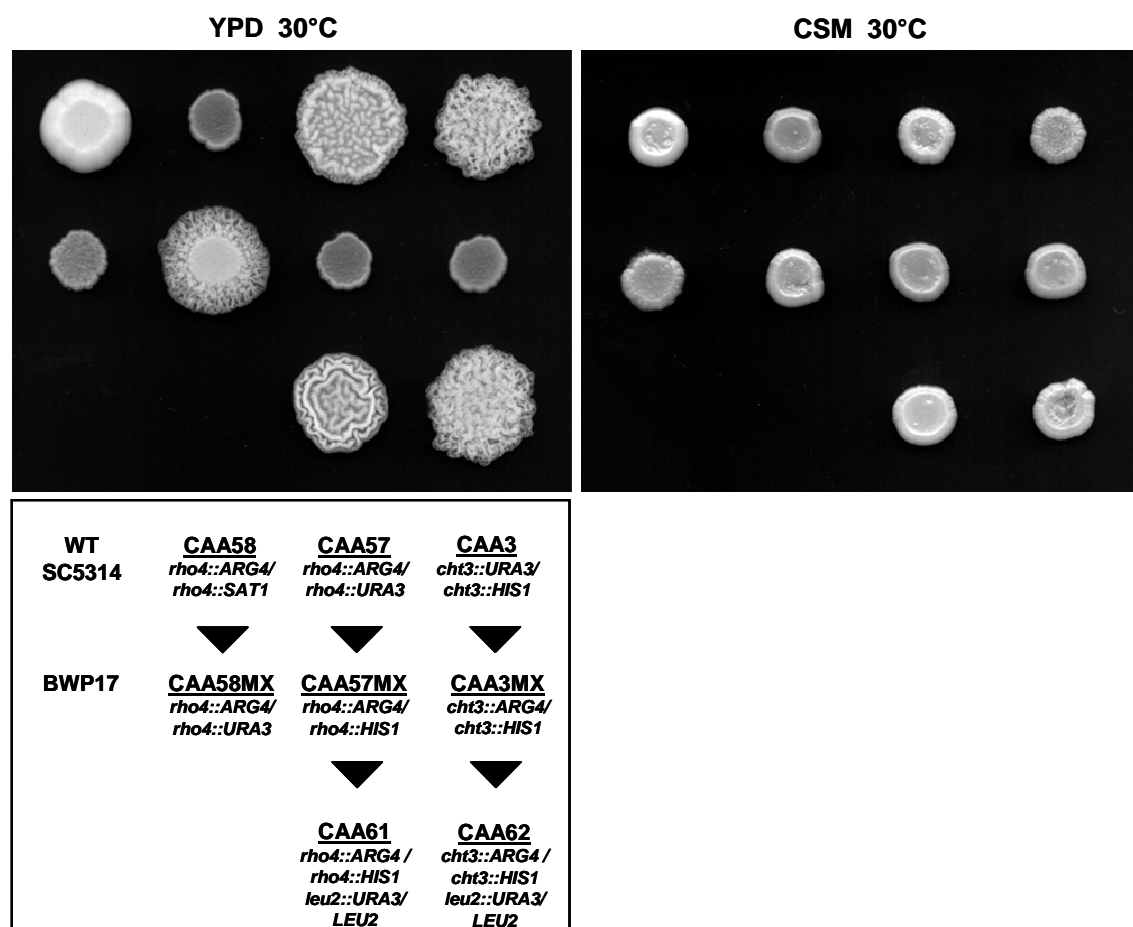


Abbildung 8: Kolonimorphologie von *Carho4* und *Cacht3*-Mutanten

Zellsuspensionen der angezeigten Stämme wurden auf YPD und CSM-Agarplatten aufgetropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die durch den Zytokinesedefekt bedingte runzelige Kolonimorphologie konnte nur bei *cht3*- und *rho4*-Stämmen mit *URA3*-Marker beobachtet werden. Fehlt dieser Marker bleiben die Kolonien glatt wie SC5314 und BWP17. Die Kolonimorphologie ist abhängig vom *URA3*-Status der untersuchten Stämme und dem Kulturmedium.

In *C. albicans* wurde das Chitinasegen *CHT3* identifiziert, welches das Funktionshomolog zum *S. cerevisiae* *CTS1* darstellt (DÜNKLER et al., 2005). Die Deletion von *CaCHT3* resultiert in einem Zytokinesedefekt ähnlich dem, der bei *rho4*-Mutanten beobachtet wurde. Eine *cht3*-Mutante mit dem Genotyp *cht3::URA3/cht3::HIS1* hatte ebenfalls eine gefurchte und faltige Kolonieoberfläche auf YPD-Agar. Der Austausch des *URA3*-Marker gegen den *ARG4* führte zu den gleichen phänotypischen Veränderungen wie in *rho4*-Mutanten. Fehlt das *URA3*-Gen in der *cht3*-Mutante, dann ist die Oberfläche der Kolonie glatt. Damit konnte auch die Abhängigkeit der Koloniemorphologie vom *URA3*-Marker in den beiden *cht3*-Stämme gezeigt werden.

Um diese Beobachtungen weiter zu untermauern, wurde in *rho4*- und *cht3*-Stämmen mit fehlendem *URA3* eine Reintegration in den *CaLEU2*-ORF vorgenommen. Wie erwartet, zeigten diese Mutanten eine runzelige Oberfläche und kürzere Generationszeiten wie zuvor. Zur Ausbildung der aufgefalteten Kolonieoberfläche kam es nur auf YPD-Vollmedienplatten. Bei einer Kultivierung auf Minimalmedien oder auf Vollmedium und 20°C sind alle Kolonien glatt.

Tabelle 10: Generationszeiten von *rho4* und *cht3* Mutanten

Stamm	Genotyp	Zellzykluslänge	Koloniemorphologie
SC5314	<i>URA3/URA3; HIS1/HIS1; ARG4/ARG4</i>	73 ±8 min	glatt
BWP17	<i>ura3/ura3; his1/his1; arg4/arg4</i>	111 ±10 min	glatt
CAA58	<i>rho4::ARG4/rho4::SAT1; ura3/ura3</i>	108 ±12 min	glatt
CAA58MX	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3; ura3/ura3</i>	92 ±9 min	runzelig
CAA57	<i>rho4::ARG4/rho4::URA3; ura3/ura3</i>	88 ±10 min	runzelig
CAA57MX	<i>rho4::ARG4/rho4::HIS1; ura3/ura3</i>	112 ±15 min	glatt
CAA61	<i>rho4::ARG4/rho4::HIS1, ura3/ura3 leu2::URA3/LEU2</i>	82 ±13 min	runzelig
CAA3	<i>cht3::URA3/cht3::HIS1; ura3/ura3</i>	90 ±11 min	runzelig
CAA3MX	<i>cht3::ARG4/cht3::HIS1; ura3/ura3</i>	102 ±16 min	glatt
CAA62	<i>cht3::ARG4/cht3::HIS1, ura3/ura3 leu2::URA3/LEU2</i>	87 ±9 min	runzelig

Mit den angegebenen Stämmen wurde in YPD-Flüssigmedien eine Wachstumskurve erstellt und die Verdopplungszeiten berechnet.

4.1.7. Hyphenbildung in *Carho4*-Mutanten

Im folgenden Versuch wurden die *rho4*-Mutanten auf Defekte während der filamentösen Wachstumsphase untersucht. Die Stämme CAA49 und CAA57 wurden unter verschiedenen Bedingungen induziert und mit dem Wildtyp SC5314 verglichen. Zunächst erfolgte die Hypheninduktion auf SD-Platten mit einer Serumkonzentration von 10%. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen bei 37°C zeigten die Kolonien des Wildtyps eine gefurchte, runzelige Oberfläche, die typisch ist für die Ausbildung von Hyphen auf Festmedien (Abbildung 9). Die Kolonien der beiden *rho4*-Mutanten unterschieden sich nicht in ihrer Oberflächenstruktur von Wildtyp-Kolonien. Die Verwendung von Spider- und LEE's-Medium für die Induktion führte bei allen untersuchten Stämmen zur Bildung von gefurchten und faltigen Kolonieoberflächen. Die Deletion von *RHO4* in *C. albicans* hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit zur Hyphenbildung. Des Weiteren wurde das filamentöse Wachstum in Flüssigkultur untersucht, um die Stämme morphologisch vergleichen zu können. Die Induktion des Wildtyps durch SD-Serum-, Spider- oder LEE's-Medium führt zu länglichen, gleich-

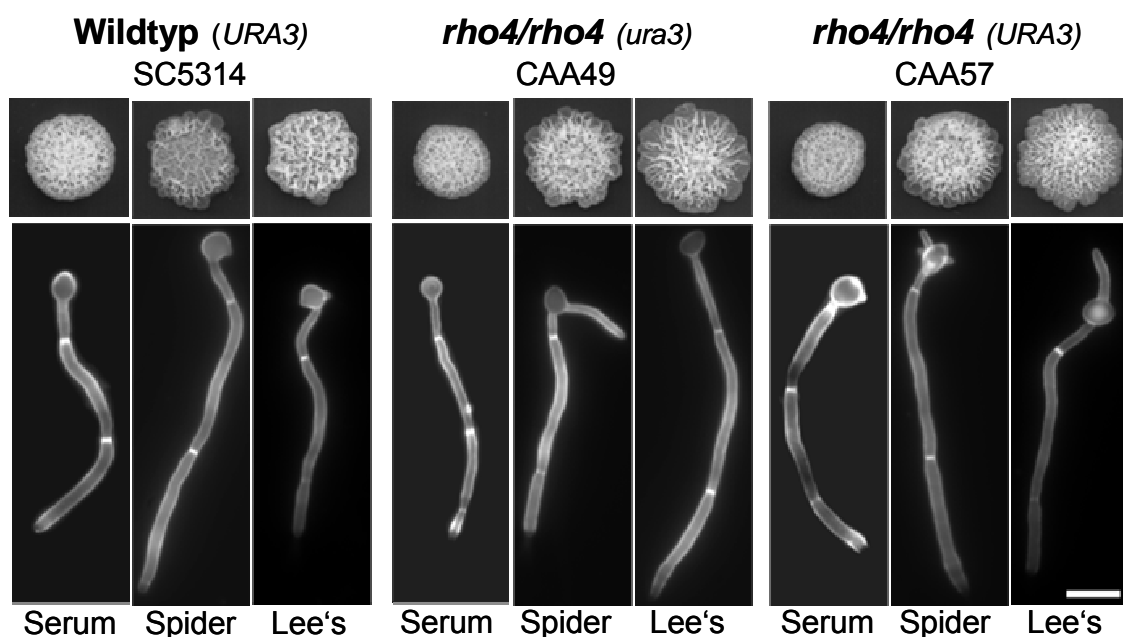


Abbildung 9: Hypheninduktion der *rho4*-Mutanten in verschiedenen Medien

Die Stämme SC5314, CAA49 und CAA57 zeigen filamentöses Wachstum in SD-Serum, Spider- und LEE's-Medium. Die Induktion auf Festmedien resultiert nach 6 Tagen bei 37°C in einer runzeligen Kolonieoberfläche. Morphologische Unterschiede in Flüssigkultur nach einer Inkubationszeit von 4h bei 37°C konnten nicht beobachtet werden. Größenbalken 10µm.

mäßig geformten Hyphen (Abbildung 9). Ein Unterschied zwischen den verwendeten Kulturmedien bezüglich der Hyphenmorphologie war nicht zu beobachten. Die Färbung mit Calcofluor zeigt die verstärkte Chitineinlagerung an den Septen. Nach einer Inkubationszeit von 4h bei 37°C sind in den meisten Hyphen zwei Septen ausgebildet. Nach der Kultivierung von CAA49 und CAA57 in den benannten Induktionsmedien, konnte für beide Stämme filamentöses Wachstum beobachtet werden. In ihrer Gestalt glichen sie den gleichmäßig schlank geformten Hyphen des Wildtyps und die Septierung erfolgte regelmäßig. Die Disruption von *CaRHO4* hat demnach keinen Einfluss auf die Hyphenmorphologie.

4.1.8. Lokalisierung von CaRho4

Für die Lokalisierung von Rho-GTPasen muss eine Fusion mit Reportergenen N-terminal erfolgen, um die Bindung dieser Proteine über ihr C-terminales CAAX-Motiv an die Membran zu gewährleisten. Als Reportergen für die *CaRHO4*-Lokalisierung wurde GFP ausgewählt. Mit den Primern atg-RHO4-EcoRI und 3'RHO4-ClaI wurde ein 1270bp großes Fragment durch eine PCR gewonnen, das den gesamten ORF und die Terminatorregion enthielt (Tabelle 4). Dieses RHO4-Fragment wurde über die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *ClaI* in den Vektor pFA HIS1-MAL2p-GFPga hinter den GA-Linker des *GFPs* kloniert (Tabelle 5). Um dieses Konstrukt genomisch integrieren zu können, wurde das HIS1-MAL2p-GFPga-CaRHO4 Fragment zwischen zwei 479bp und 633bp große *CaLEU2*-Fragmente in den Vektor pHIEb kloniert. Das GFP-CaRHO4 Fragment wurde durch eine Restriktion mit *Bam*HI und *Sac*II gewonnen und konnte durch eine Klenow-Behandlung in pHIEb mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RV fusioniert werden. Die *GFP-RHO4*-Kassette wurde durch eine Restriktion des entstandenen Plasmids pHIEb HIS1-MAL2p-GFPga-CaRHO4 mit *Sac*I und *Aat*II gewonnen und in die *rho4*-Mutante CAA57 transformiert. Über PCR konnte die Integration der Kassette in den *CaLEU2*-Lokus nachgewiesen werden.

Die Expression von *GFP-CaRHO4* erfolgt durch den *MAL2*-Promotor in der *rho4*-Mutante. Um eine Expression unter dem *MAL2p* zu gewährleisten, ist eine Kultivierung in SM-Medium mit Maltose als Kohlenstoffquelle nötig. Zunächst wurden die Zellen von CAA69 auf GFP-Signale in der Hefephase untersucht. Die Lokalisierung

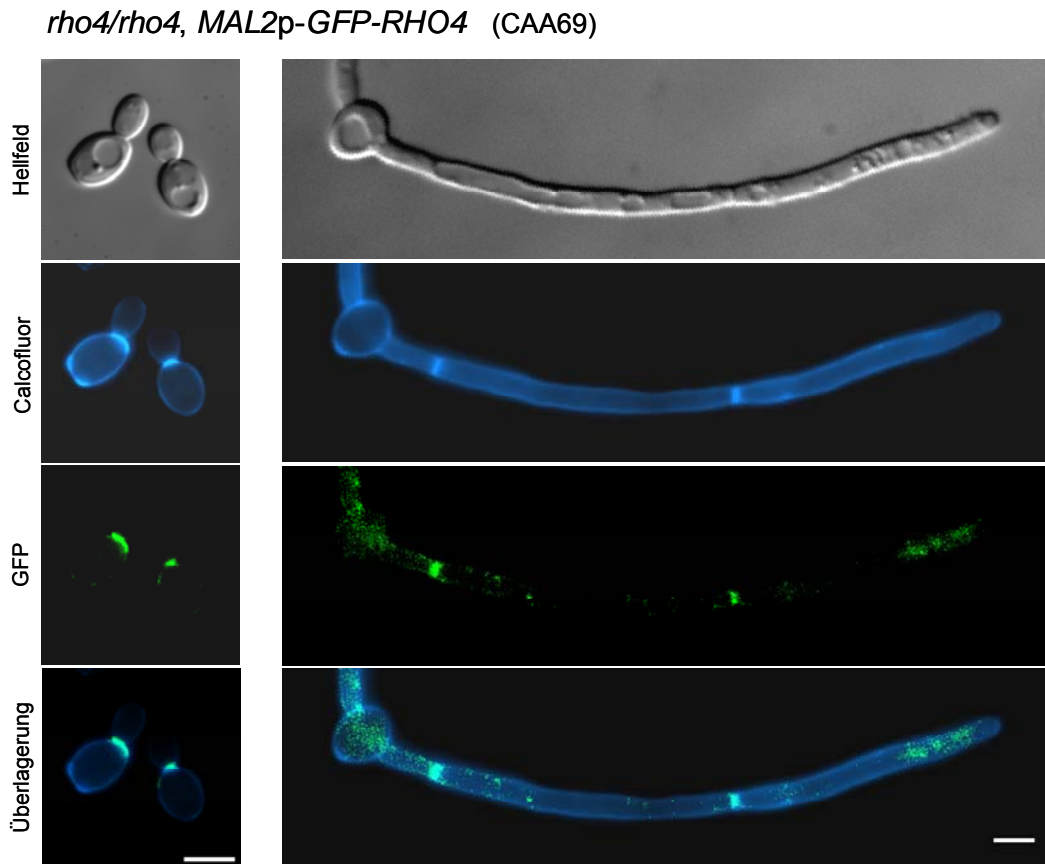


Abbildung 10: GFP-Lokalisierung von CaRho4p in der Hefe- und Hyphenphase

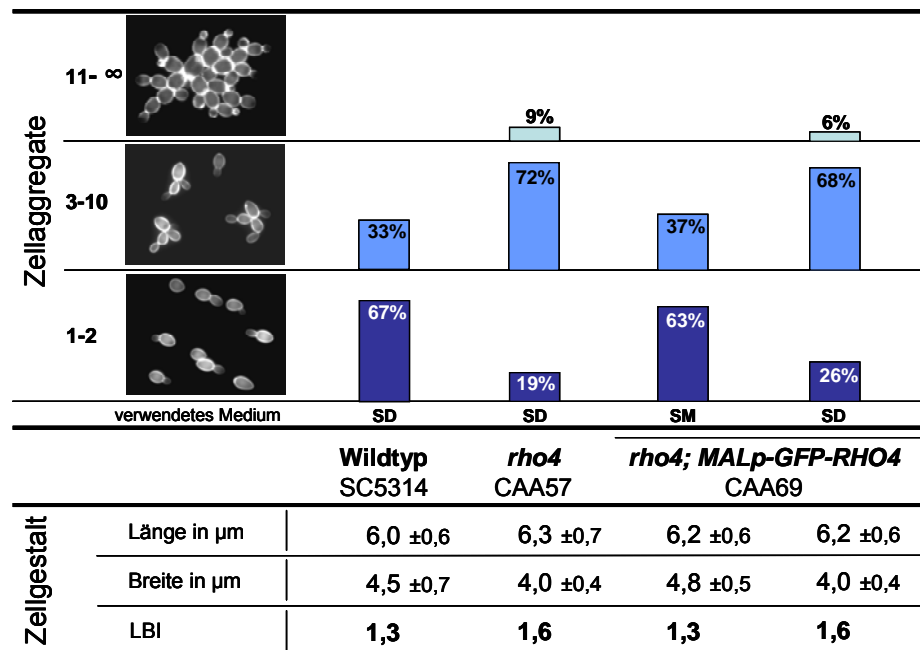
Ein MAL2p-GFPga-RHO4 Konstrukt wurde in den *LEU2*-ORF einer *rho4*-Mutante integriert. Durch die Kultivierung auf Maltose-haltigem Medium wird *GFP-RHO4* exprimiert. Die Hypheninduktion erfolgte durch 10% Serum für 4h. CaRho4p lokalisiert in der Hefe- und Hyphenphase über die gesamte Breite des Septums. Größenbalken 5µm.

von Rho4p wurde an Septen zwischen Mutter- und Tochterzellen beobachtet (Abbildung 10). Das GFP-Signal war über die gesamte Breite der Septen zu beobachten. Durch die Färbung mit Calcofluor, konnten die chitinreichen Septen sichtbar gemacht werden und eine eindeutige Kolo-kalisierung von Septum und GFP-Signal gezeigt werden. Für die Untersuchung der Rho4p-Lokalisierung in der filamentösen Wachstumsphase wurden die Hefezellen mit 10% Serum und einer Temperaturerhöhung auf 37°C induziert. In der Hyphenphase erfolgt die Lokalisierung von Rho4 ebenfalls an den Septierungsstellen. Die Überlagerung des GFP- Signals mit dem der Calcofluor gefärbten Septen, zeigt die identische Positionierung in der Hyphe (Abbildung 10). Nach einer Induktionszeit von 4h sind in den meisten Hyphen zwei Septen ausgebildet, die im Falle von CAA69 beide ein GFP-Signal zeigen. CaRho4 lokalisiert sowohl in der Hefe, als auch in der Hyphenphase über die ganze Breite des Septums.

4.1.9. Komplementierung der *Carho4*-Defekte

Zur Bestätigung des in den *rho4*-Mutanten festgestellten Zytokinesedefekts und der Bildung länglicher Hefezellen, wurde eine Reintegration des *RHO4*-Gens durchgeführt. Für diesen Komplementierungsversuch wurde der für die Lokalisierung verwendete Stamm CAA69 benutzt. In dieser Mutante wurden beide *RHO4*-Allele komplett deletiert und danach ein *MAL2p-GFP-RHO4*-Fragment in den *LEU2*-Lokus genomisch integriert. Eine Kultivierung dieses Stammes in SM-Medium sollte zu einer Aufhebung der *RHO4*-Defekte führen. Um die Unterschiede durch den Zytokinesedefekt zwischen Wildtyp und *rho4* genauer beschreiben zu können, wurden 3 Kategorien zur Erfassung der Zellkettenlänge erstellt. Zur ersten Kategorie zählen einzelne Hefen oder sich in Teilung befindliche Mutterzellen mit ihren Tochterzellen. In einer zweiten Kategorie wurden alle diejenigen zusammengefasst, die Zellketten bilden, bei denen 3 bis 10 Zellen aneinander hängen. Die Kategorie 3 beinhaltet den Anteil der Hefen, die in Aggregaten von mehr als 10 Zellen miteinander verbunden sind. Für den Wildtyp SC5314 konnte ein Anteil von 67% von Einzelzellen und sich in Teilung befindlicher

Tabelle 11: Komplementierung der *rho4*-Mutante durch *GFP-RHO4* Expression



Eine Expression von *GFP-RHO4* durch den *MAL2*-Promotor führt zu einer Aufhebung des Zytokinesedefekts und der veränderten Zellgestalt. Unter reprimierenden Bedingungen in SD-Medium zeigt CAA69 den *rho4* Phänotyp. Für die Analyse des Zellteilungsdefekts wurden 400 bis 500 Zellen ausgezählt. Die Vermessung von Länge und Breite erfolgte an jeweils 130 bis 200 Hefen.

Zellen bestimmt werden. Die restlichen 33% sind Zellaggregate von meist 3 bis 4 Zellen (Tabelle 11). Ordnet man die Zellketten der *rho4*-Mutante CAA57 den einzelnen Kategorien zu, so sinkt der Anteil von Einzelzellen im Vergleich zum Wildtyp auf 19%. Die meisten Zellen in diesem Stamm bilden Ketten von 3 bis 10 Zellen (72%). Nur ein geringer Prozentsatz von 10% bildet größere Aggregate. Um den Zytokinesedefekt zu komplementieren, wurde CAA69 in SM-Medium angezogen, was zu einer Expression des durch den *MAL2p* kontrollierten *GFP-RHO4*-Allels führt. Das Wachstum in SD-Medium hat eine Reprimierung des *MAL2p* zur Folge. Nach Inkubation in SM sind 63% und in SD 26% Einzelhefen oder verbundene Mutter- und Tochterzellen zu finden. In der Kategorie 2 verschiebt sich das Verhältnis auf 37% zu 68% zwischen in SM- und SD-Medium angezogenen Zellen (Tabelle 11). Die Expression von *GFP-RHO4* durch den *MAL2p* führt zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Wird die Expression von *RHO4* durch das Fehlen von Maltose reprimiert, so kann der Zytokinesedefekt der *rho4*-Mutanten nicht aufgehoben werden.

Die angezogenen Kulturen wurden neben der Kategorisierung des Zytokinesedefektes auch zur Vermessung der Länge und Breite benutzt. Die *rho4*-Hefen zeigen eine länglich, ovale Gestalt mit einem LBI von 1,6, während die Hefen von SC5314 rundlicher sind und einen LBI von 1,3 besitzen (Tabelle 11). Die in SM kultivierten Hefen von CAA69 haben eine durchschnittliche Länge von 6,2µm und sind 4,8µm breit. Ihr LBI von 1,3 ist mit dem des Wildtyps vergleichbar. Bei einem Wachstum dieses Stammes in SD-Medium kann der *rho4*-Phänotyp nicht komplementiert werden, der LBI beträgt wie in CAA57 1,6. Die Reintegration von *CaRHO4* führt also zu einer Aufhebung von beiden Phänotypen, dem Zytokinesedefekt und der länglichen Zellgestalt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das *GFP-CaRHO4* neben der Fähigkeit zur Lokalisierung auch funktionell ist.

4.1.10. Überexpression von *CaENG1* hebt den Zytokinesedefekt in *rho4*-Mutanten auf

Die in der Zellwand von *C. albicans* enthaltenen Polysaccharide Glucan und Chitin verleihen der Zelle Stabilität und Steifheit. Das bei der Zellteilung gebildete Septum ist besonders reich an Chitin. Bei der Mitose erfolgt nach der Kernteilung die Zellteilung, bei deren letztem Schritt die Trennung von Mutter und Tochterzelle vollzogen wird.

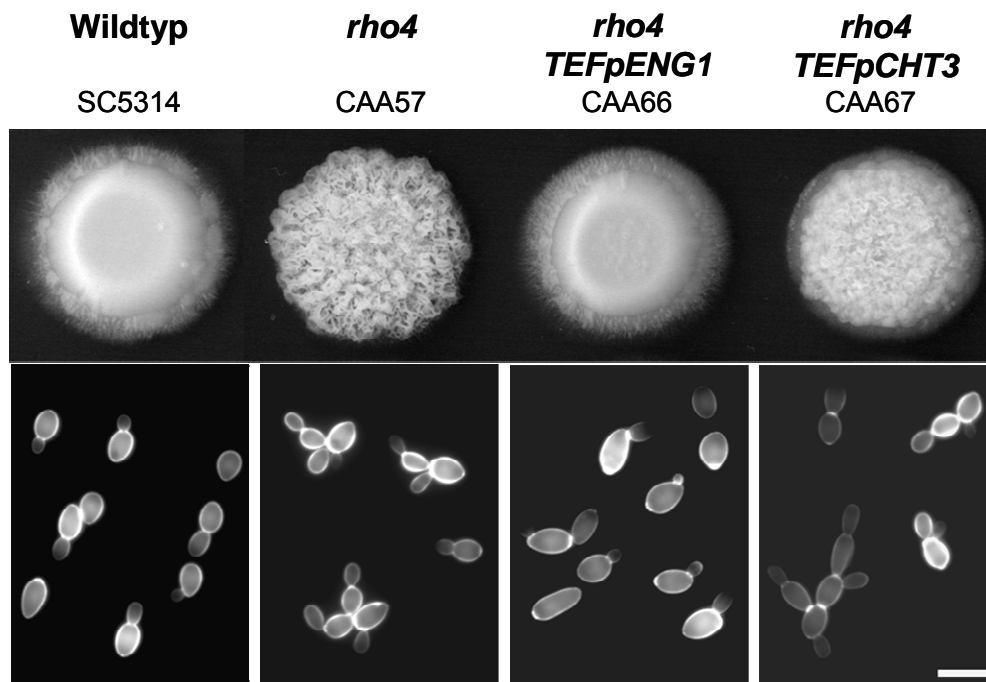


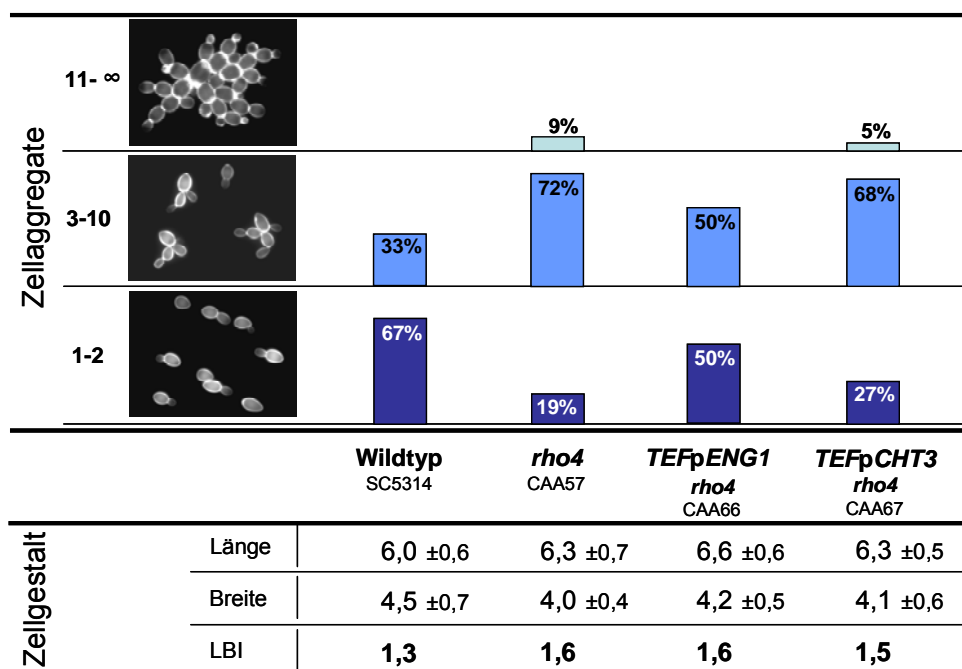
Abbildung 11: Überexpression von *CaCHT3* und *CaENG1* in einer *rho4*-Mutante

Die Allele von *CHT3* und *ENG1* wurden genomisch mit den *AgTEFp* in *rho4*-Mutanten fusioniert. Die Untersuchung der Kolonimorphologie erfolgte auf YPD-Platten bei 30°C und zeigt eine glatte Oberfläche bei CAA66 und SC5314. Die Stämme CAA57 und CAA67 zeigen runzelige Kolonien aufgrund eines Zytokinesedefekts, der durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt wurde. Größenbalken 10µm

Das Septum, als Verbindung zwischen beiden Zellen, wird durch die Hydrolyse von Glucan und Chitin aufgelöst. In *C. albicans* kodieren die Gene *CHT3* und *ENG1* für eine Chitinase bzw. eine β -1,3-Endoglucanase und begleiten Funktionen während der Zelltrennung (DÜNKLER et al., 2005; ESTEBAN et al., 2005). Deletionsmutanten von *CHT3* oder *ENG1* zeigen einen Zytokinesedefekt. Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von *CHT3* oder *ENG1* den Zellteilungsdefekt von *rho4*-Stämmen aufheben kann, wurde jeweils ein Allel dieser Gene mit dem *TEF1*-Promotor aus *A. gossypii* fusioniert. Die Analyse der Kolonimorphologie von CAA66 und CAA67 ergab unterschiedliche Oberflächenstrukturen auf YPD bei 30°C. Eine konstitutive Expression von *ENG1* in Abwesenheit von *RHO4* (CAA66) führt zu einer glatten, glänzenden Kolonieoberfläche. Die Überexpression von *CHT3* hatte keine Änderung der Kolonimorphologie zur Folge. CAA67 und *rho4*-Mutanten zeigen gefaltete, runzelige Kolonien (Abbildung 11). Untersuchungen dieser Stämme in Flüssigkultur bestätigten die beobachteten Phänotypen auf Festmedien. CAA57 und CAA67 zeigten das für *rho4*-Mutanten typische Wachstum in Zellketten. Die Überexpression von

ENG1 in CAA66 resultiert in Einzelzellen. Der Zytokinesedefekt durch die Deletion von *RHO4* wurde durch eine konstitutive Expression dieser Endoglucanase aufgehoben. Die quantitative Analyse der Zellteilung von CAA66 ordnete 50% der Zellen in die Kategorie von Einzelhefen (Tabelle 12). Im Falle von CAA57 und CAA67 liegen die meisten Zellen in Ketten von 3 bis 10 Hefen vor und ein Anteil von 9% und 5% bildeten Ketten, die aus mehr als 10 Hefenzellen bestanden. Für diese Kategorie wurden bei einer *AgTEFp-ENG1* Expression keine Zellen gefunden.

Tabelle 12: Analyse der Zellteilung und Zellform bei Expression von *ENG1* und *CHT3* in *rho4*-Mutanten



Die dargestellten Stämme wurden bezüglich ihrer Zellteilung kategorisiert und in Länge und Breite vermessen. Durch die Überexpression von *ENG1* in *rho4* Zellen wird der Zytokinesedefekt aufgehoben. Die Länge-Breite-Indizes (LBI) von CAA66 und CAA67 entsprachen jedoch der der *rho4*-Mutanten. Für die Analyse des Zellteilungsdefekts wurden 400 bis 500 Zellen ausgezählt, die Länge und Breite wurde an jeweils 130 bis 200 Hefen vermessen.

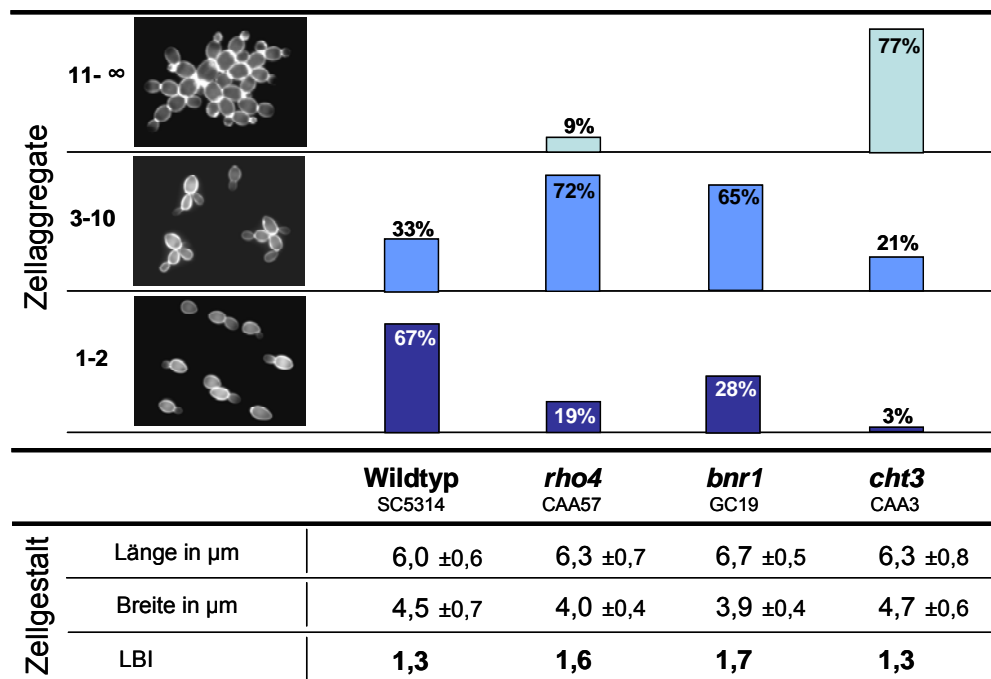
Die Hefen der *rho4*-Mutanten haben eine länglichere, schlankere Gestalt mit einem erhöhten LBI von 1,6. Die Vermessung der Hefezellen von CAA66 und CAA67 in Länge und Breite sollte Effekte durch die Überexpression von *CHT3* und *ENG1* sichtbar machen. Beide Stämme hatten durchschnittlich mit 6,6µm und 6,3µm längere Hefezellen als der Wildtyp. In der Breite konnten keine Unterschiede zwischen CAA66

und CAA67 festgestellt werden. Es ergab sich ein Länge-Breite-Index von 1,6 und 1,5 (Tabelle 12). Diese Werte entsprechen dem LBI von *rho4*-Mutanten. Durch die Überexpression von *ENG1* wird zwar der Zellteilungsdefekt aufgehoben, aber die längliche Gestalt der Hefezellen bleibt erhalten.

4.1.11. Phänotypischer Vergleich zwischen *bnr1* und *rho4* Mutanten

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die GTPase *RHO4* und das Formin *BNR1* miteinander interagieren (IMAMURA et al., 1997). Bei der Analyse des *BNR1*-Gens in *C. albicans* wurde in der Deletionsmutante eine Änderung der Morphologie festgestellt (MARTIN et al., 2005). Die Hefezellen von *Cabnr1* zeigen eine länglich, schlanke Gestalt und es wurde ein leichter Zelltrennungsdefekt beobachtet. Vergleicht man die

Tabelle 13: Analyse des Zytokinesedefekts und der Zellform in *bnr1*, *rho4* und *cht3* Stämmen



Die Anzahl der Hefezellen pro Zellkette der dargestellten Stämme wurde 3 Kategorien zugeordnet. Die Mutanten zeigten eine Abstufung in der Stärke des Zellteilungsdefekts. Aus den vermessenen Längen und Breiten wurden die Länge-Breite-Indizes berechnet, wobei *bnr1* und *rho4*-Mutanten eine veränderte Zellform zeigten. Für die Analyse des Zellteilungsdefekts wurden 400 bis 500 Zellen ausgezählt, die Länge und Breite wurde an jeweils 130 bis 200 Hefen vermessen.

Länge und Breite der *bnr1*-Mutante mit *rho4*-Hefen, dann sind morphologische Gemeinsamkeiten vorhanden. Die Zellen von *rho4* sind mit 6,3µm und 4,0µm ebenfalls länger und schlanker als die des Wildtyps, was sich in einem LBI von 1,6 niederschlägt. Die *bnr1*-Mutante hat einen LBI von 1,7 (Tabelle 13). Beide Mutanten sind sich in ihrer Zellgestalt ähnlich. Die *bnr1*-Mutante hat einen leichten Zytokinesedefekt, der nicht so stark ausfällt wie bei einer Deletion von *RHO4*. Der Anteil von Einzelzellen ist höher (28%) als in der *rho4*-Mutante (19%). Außerdem konnten in dem *bnr1*-Stamm keine Zellketten beobachtet werden die aus mehr als 10 Hefen bestanden. Der Zellteilungsdefekt in der Chitinase-Mutante *cht3* ist noch wesentlich stärker ausgeprägt als in *bnr1* und *rho4*-Mutanten (Tabelle 13). Die Form der Hefen im *cht3*-Stamm ist identisch mit dem des Wildtyps SC5314. Es ist kein Zusammenhang zwischen Zytokinesedefekt und veränderter Zellgestalt herzustellen.

4.1.12. Lokalisierung von CaBnr1p in Hefe- und Hyphenphase

Aufgrund einer möglichen Interaktion zwischen *CaBNR1* und *CaRHO4* wurde versucht Bnr1 in *C. albicans* zu lokalisieren. In dem für die Lokalisierung des Rho4 genutzten Konstruktes wurde der *RHO4*-ORF gegen ein 4646bp großes Fragment des *BNR1*-ORFs mit Terminatorregion ausgetauscht. Das N-terminal fusionierte *BNR1* im Plasmid pHIEc SAT1-MAL2p-GFPga-BNR1 wurde genomisch in den *LEU2*-ORF der *bnr1*-Mutante GC19 integriert. Durch die Kultivierung der erhaltenen Mutante CAA74 in Maltose-haltigem Medium wurde die Expression des *GFP-BNR1* gesichert. Bnr1 lokalisiert während der Hefephase am Septum (Abbildung 12). Die Lokalisierung erfolgt jedoch nicht über die gesamte Breite des Septums sondern punktuell. In der Hyphenphase war ein GFP-Signal nur am Septum zu sehen. Das Signal war wie in der Hefephase nur an Teilen des Septums zu beobachten. Die Lokalisierung von Bnr1 erfolgt also genauso wie von Rho4 am Septum unabhängig von Hefe- oder Hyphenwachstum.

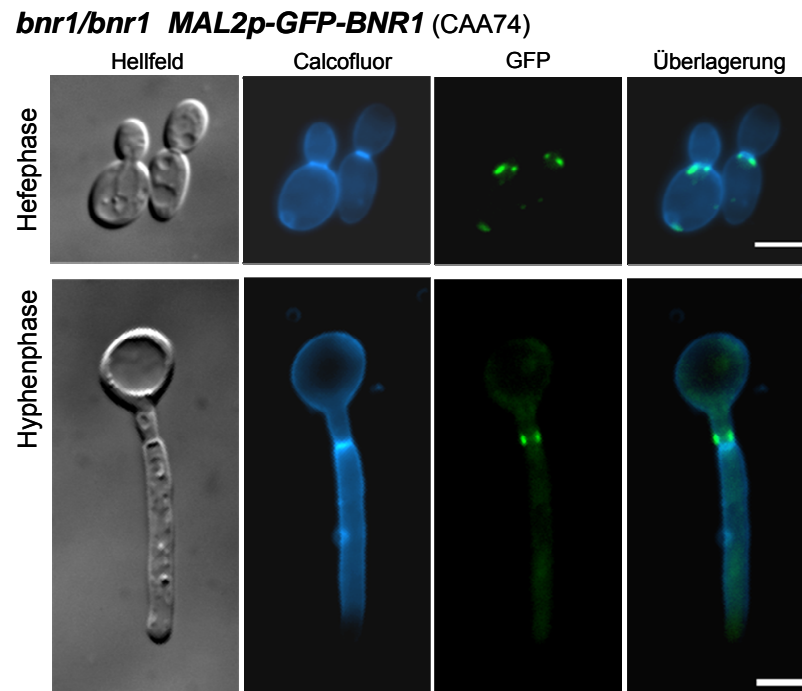


Abbildung 12: Lokalisierung von CaBnr1 in Hefe- und Hyphenphase

Ein SAT1-MAL2p-GFP-BNR1 Konstrukt wurde in den *LEU2*-Lokus integriert und die Expression durch Wachstum in SM-Medium gesichert. Bnr1 lokalisiert punktuell am Septum während der Hefephase. Nach einer Induktion mit 10% Serum für 2h, ist Bnr1 am Septum in den Hyphen zu beobachten. Größenbalken 5µm.

4.2. Die Chitinase Cts2 in *A. gossypii*

4.2.1. Proteinvergleich sporulations-spezifischer Chitinasen

In der publizierten Genomsequenz von *A. gossypii* konnte eine homologe Chitinase zum *S. cerevisiae* CTS2-Gen, *AgCTS2* identifiziert werden (<http://agd.unibas.ch/>). Das ScCts2 ist eine sporulations-spezifische Chitinase, die sich gegenüber der zweiten Chitinase ScCts1 in ihrer Domänenstruktur unterscheidet. Im Genom von *A. gossypii* konnte kein Homolog zu *ScCTS1* gefunden werden. *AgCTS2* stellt damit die einzige Chitinase in *A. gossypii* dar und wurde als ACL166W annotiert. Dieses Gen besitzt einen offenen Leserahmen von 1473 Nukleotiden, kein Intron und ist auf Chromosom 3 lokalisiert.

Die Analyse des aus 490 Aminosäuren bestehenden Genproduktes von *AgCTS2* bei der Protein-Familien-Datenbank (PFAM) des Sanger-Instituts (BATEMAN et al., 2004; www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) und der Vergleich mit den sporulations-spezifischen Chitinasen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* ergab eine Zugehörigkeit zur

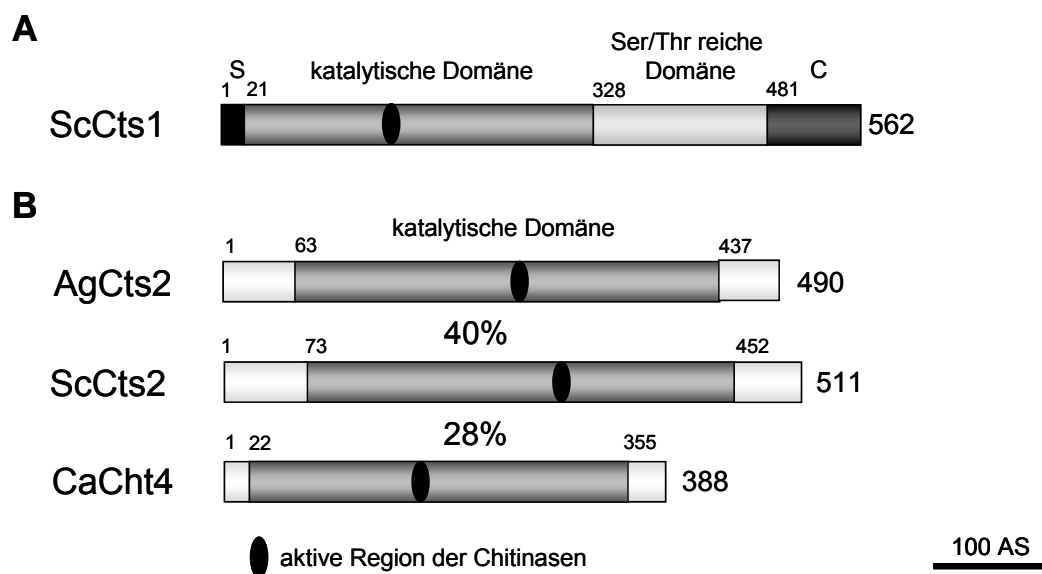


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Endo- und sporulations-spezifischen Chitinasen

(A) Bei der Endochitinase Cts1 von *S. cerevisiae* geht der N-terminalen katalytischen Domäne (grau) eine kurze Signalsequenz (S) voraus. Die Serin/Threonin reiche Domäne ist hellgrau dargestellt. C-terminal befindet sich eine Chitin-Binde-Domäne (C, dunkelgrau). (B) Die dargestellten sporulations-spezifischen Chitinasen besitzen lediglich die katalytische Domäne. Im Zentrum der katalytischen Domäne dieser glycosidischen Hydrolasen befindet sich die stark konservierte aktive Region.

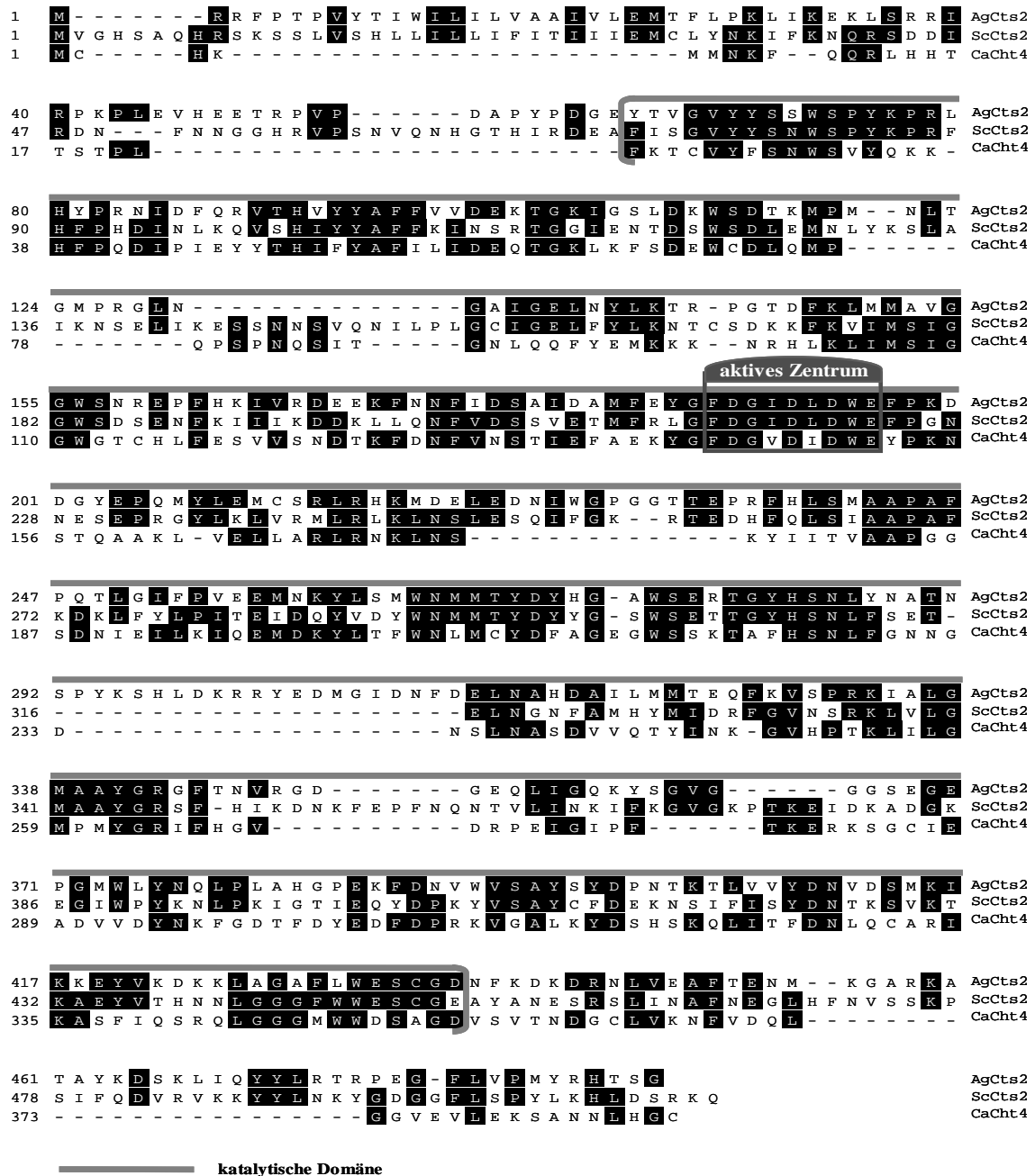


Abbildung 14: Proteinvergleich der Sporulations-spezifischen Chitinasen von *A. gossypii* (AgCts2), *S. cerevisiae* (ScCts2) und *C. albicans* (CaCht4)

Die identischen Aminosäuren von AgCts2, ScCts2 und CaCht4 sind schwarz markiert. Die katalytische Domäne ist durch einen grauen Balken gekennzeichnet. Die für die Hydrolyse des Chitins wichtigen Aspartat- und Glutamatreste sind durch einen dunkelgrauen Rahmen markiert.

Familie 18 glycosidischen Hydrolasen (Abbildung 13). Weitere funktionelle Domänen konnten bei den sporulations-spezifischen Chitinasen nicht identifiziert werden. Die katalytische Domäne, die für die hydrolytische Spaltung des Polysaccharides Chitin in einzelne *N*-Acetylglucosamin Monomere verantwortlich ist, erstreckt sich von Aminosäure 330 bis 380. Im AgCts2 befindet sich diese Domäne zwischen Aminosäure 63 und 437 (Abbildung 14). Ein Proteinsequenzvergleich der Chitinasen von *A. gossypii*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* zeigt eine Ähnlichkeit des AgCts2 zum ScCts2 von 34% und zum CaCht4 von 23%. Die Sequenzidentität der katalytischen Domänen von *A. gossypii* zu der von *S. cerevisiae* beträgt 40% und die zu CaCht4 28% (Abbildung 13). Die funktionelle Domäne der Chitinasen ist stärker konserviert, als die flankierenden N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen.

Die katalytische Domäne besitzt ein aktives Zentrum, welches in der Lage ist, die β 1,4-glycosidischen Bindungen zwischen den *N*-Acetylglucosaminen des Chitins aufzuspalten. Das aktive Zentrum von AgCts2 besteht aus einer Abfolge von neun Aminosäuren (FDGIDLDWE) in der Position 188 bis 196 des Proteins (Abbildung 15). Die sporulations-spezifischen Chitinasen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* besitzen dieses Sequenzmotiv ebenfalls und sind im Falle von ScCts2 vollständig identisch, bei CaCht4 zu 78%.

Neben den sporulations-spezifischen Chitinasen findet man im Genom von *S. cerevisiae* und *C. albicans* weitere Chitin hydrolysierende Enzyme, die als Exo- und Endochitinasen bezeichnet werden. In *C. albicans* sind das die Gene *CHT1*, *CHT2* und *CHT3*, wohingegen bei *S. cerevisiae* mit *CTS1* nur eine weitere Chitinase identifiziert werden konnte. Diese Chitinasen zeichnen sich durch das Vorhandensein mehrerer funktioneller Domänen aus. Sie sind ebenfalls zugehörig zur Familie 18 der glycosidischen Hydrolasen. Die für die Hydrolyse des Chitins wichtigen Aspartat- und Glutamatreste des aktiven Zentrums sind bei allen Chitinasen identisch (Abbildung 15). Bei den Exo- und Endochitinasen schließt sich an die katalytische Domäne C-terminal eine Serin/Threonin-reiche Domäne an, die für den Transport des Enzyms zur Zellmembran notwendig ist. ScCts1p besitzt in der C-terminalen Region eine Chitin-Binde-Domäne die bei *CHT1*, *CHT2* und *CHT3* nicht gefunden werden konnte.

AgCts2p	F	D	G	I	D	L	D	W	E	sporulations- spezifische Chitinasen
ScCts2p	F	D	G	I	D	L	D	W	E	
CaCht4p	F	D	G	V	D	I	D	W	E	
ScCts1p	V	D	G	F	D	F	D	I	E	Exo- und Endochitinasen
CaCht1p	V	D	G	F	D	F	D	I	E	
CaCht2p	V	D	G	F	D	F	D	I	E	
CaCht3p	L	D	G	F	D	F	D	I	E	

Abbildung 15: Proteinsequenz des aktiven Zentrums von Chitinasen

Die für die Hydrolyse des Chitins notwendigen invarianten Aspartat- und Glutamatreste des aktiven Zentrums sind schwarz unterlegt.

Aufgrund der Unterschiede in der Domänenstruktur können die Chitinasen bei einem Proteinvergleich in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Mit den Daten des Proteinvergleichs wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, der diese Ergebnisse verdeutlicht (Abbildung 16). Die zu den Exo- und Endochitinasen gehörigen Proteine bilden eine eigenständige Gruppe, innerhalb derer sich ScCts2 zum CaCht3 gruppiert, gefolgt von CaCht1 und CaCht2. In der zweiten Gruppe formieren sich die sporulations-spezifischen Chitinasen. Die höchste Sequenzidentität zwischen AgCts2 und ScCts2 gab Hinweise auf die Funktionshomologie dieser beiden Enzyme. CaCht4 hat innerhalb dieser Gruppe eine geringere Sequenzidentität zu den sporulations-spezifischen Chitinasen von *A. gossypii* und *S. cerevisiae*.

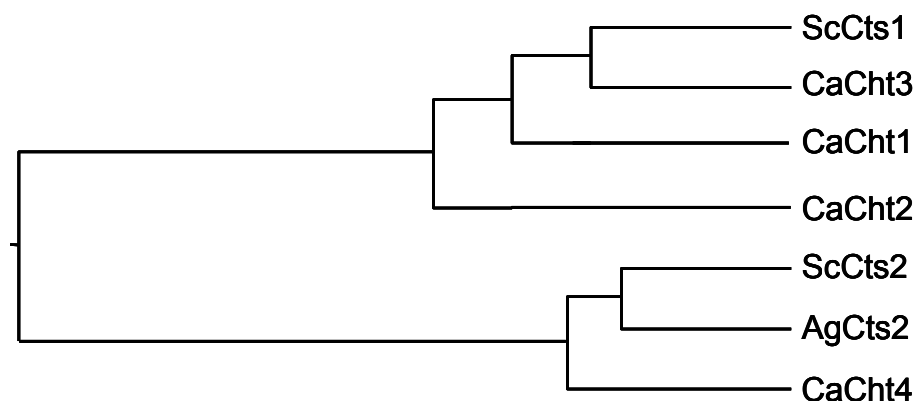


Abbildung 16: Phylogenetischer Stammbaum der Chitinasen von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *A. gossypii*

Dieser Stammbaum wurde aus den Proteinsequenzen der Chitinasen von *S. cerevisiae* (Sc), *A. gossypii* (Ag) und *C. albicans* (Ca) mit Hilfe der DNASTAR-Software erstellt.

4.2.2. Deletion des *CTS2*-Gens in *A. gossypii*

Für die Deletion des *CTS2*-ORFs in *A. gossypii* wurden genspezifische Disruptionskassetten kloniert. Zunächst erfolgte die Ligation eines 2020bp großen PCR-Fragments des *AgCTS2*-Gens, dass durch die Oligonukleotidprimer 5'AgCTS2 und 3'AgCTS2 amplifiziert wurde, in pDrive (Tabelle 4). Im Folgenden wurden die Selektionsmarker *NATMX2* und *ScLEU2* so in das *AgCTS2*-Gen, im Plasmid pAgCTS2 eingefügt, dass diese das Startkodon und große Teile des ORFs ersetzten (Tabelle 5). Zu diesem Zwecke wurden die Restriktionsschnittstellen *SpeI* in Promotorbereich, *BglIII* (*NATMX2*) und *MscI* (*LEU2*) im ORF von *AgCTS2* genutzt. Die Selektionsmarker in den zwei entstandenen Plasmiden pAgCTS2-NATMX2 disrup-cass und pAgCTS2-LEU2 disrup-cass sind durch 400 bzw. 1000bp große *CTS2*-Promotor- und *CTS2*-Terminator-Sequenzen flankiert. Die Disruptionskassetten wurden durch Restriktion mit *SalI* oder durch PCR gewonnen und in *A. gossypii* transformiert.

Die homologe Insertion der hier beschriebenen *cts2::NATMX2*- und *cts2::LEU2*-Deletionskassetten führte jeweils zur Disruption des *AgCTS2*-ORFs im *Agleu2*-Stamm. Nach der Transformation wurden homokaryotischen Transformanten durch Mikromanipulation erzeugt und mittels PCR nachgewiesen. Auf diese Weise entstanden die beiden unabhängigen homokaryotischen *Agcts2*-Mutanten ADA17 und ADA19 (Tabelle 2).

4.2.3. Wachstumsvergleich von *Agcts2*, Wildtyp und *Agleu2*

Für die phänotypische Charakterisierung der Deletion des *CTS2*-Gens in *A. gossypii* wurde zunächst das Wachstum der beiden unabhängigen Mutanten ADA17 und ADA19 auf Fest- und Flüssigmedium untersucht. Für einen Wachstumstest auf Festmedium wurden kleine Myzelstücke des jeweiligen Stammes mittig auf AFM- und CSM-Agarplatten aufgebracht.

Tabelle 14 zeigt die durchschnittlichen Koloniedurchmesser von jeweils 6 Platten der untersuchten Stämme *AgWT*, *Agleu2*; ADA17 und ADA19 nach einer Inkubation bei 30°C für 7 Tage. Das Wachstum auf AFM-Medium ist bei allen Stämmen etwas besser

Tabelle 14: Wachstumsvergleich auf Festmedium von *Agcts2* mit *AgWT* und *Agleu2*

Medium	<i>AgWT</i>	<i>Agleu2</i>	<i>Agcts2::NATMX2</i> ADA17	<i>Agcts2::LEU2</i> ADA19
AFM	6,5cm \pm 0,3	5,8cm \pm 0,2	5,4cm \pm 0,1	6,4cm \pm 0,3
CSM	5,3cm \pm 0,2	4,6cm \pm 0,3	4,4cm \pm 0,2	5,5cm \pm 0,3

Die Tabelle zeigt die durchschnittlich gemessenen Durchmesser der Stämme *AgWT*, *Agleu2*, ADA17 und ADA19 auf AFM- und CSM-Agarplatten nach 7 Tagen Inkubation bei 30°C.

als auf CSM-Minimalmedium. Im Falle des *A. gossypii* Wildtyps betrug der Koloniedurchmesser 6,5cm beim Wachstum auf AFM- und 5,3cm auf CSM-Agarplatten. ADA19, der Deletionsstamm mit dem Auxotrophiemarker *LEU2*, verhält sich bezüglich seines Wachstums identisch zum Wildtyp. Es wurden Koloniedurchmesser von 6,4cm auf AFM und 5,5cm auf CSM-Medium gemessen. Für *Agleu*, dem Ausgangsstamm der Transformationen, und ADA17 wurde ein langsames Wachstum festgestellt. Aufgrund der Auxotrophie für Leucin muss diese Aminosäure von beiden Stämmen aus dem Medium aufgenommen werden und kann nicht selbst synthetisiert werden. Die Verwendung des *NATMX2*-Marker hat dagegen keine Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Auf AFM-Agarplatten betrugen die Koloniedurchmesser des *Agleu2* 5,8cm und von ADA17 5,4cm. Auf CSM-Medium waren zwischen diesen Stämmen mit 4,6cm bzw. 4,4cm nur geringe Wachstumsunterschiede festzustellen. Morphologische Unterschiede in der Oberflächenstruktur der vier untersuchten Stämme waren nicht zu erkennen.

Um genauere Aussagen über das Wachstumsverhalten und eventuelle morphologische Unterschiede treffen zu können, wurden weitere Versuche mit Flüssigkulturen durchgeführt. Dafür wurde Myzel des *A. gossypii* Wildtyps und ADA19 in AFM-Flüssigmedium für 16h im Schikanekolben bei 30°C und 140U/min angezogen und anschließend mikroskopiert (Abbildung 17). Beide Kulturen waren nach der angegebenen Inkubationszeit gleichmäßig dicht gewachsen. In der Hyphengestalt der beiden untersuchten Stämme konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Es wurde dichotom verzweigtes, regelmäßig septiertes Myzel beobachtet.

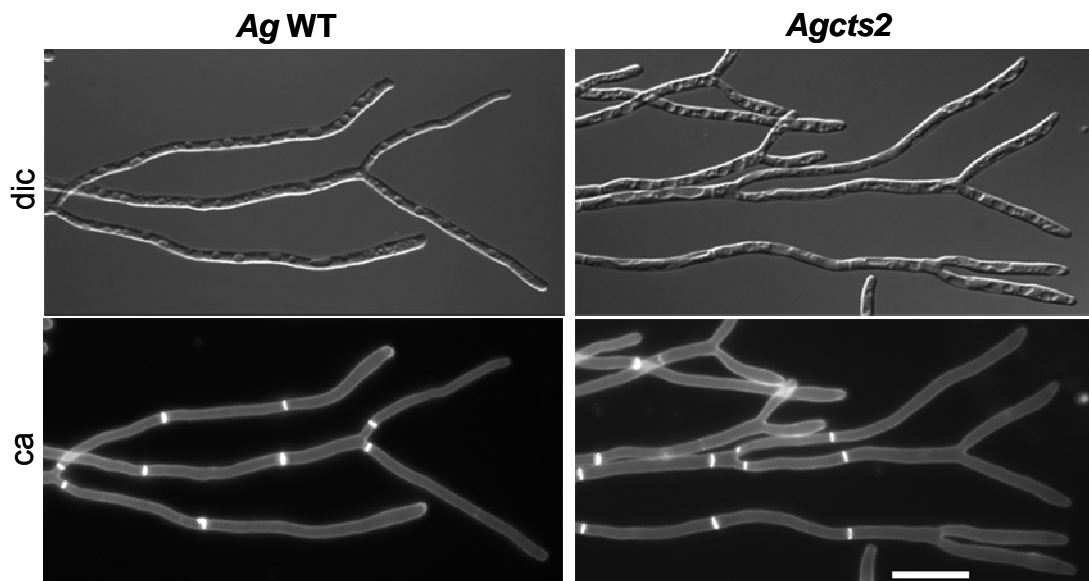


Abbildung 17: Vergleich der Hyphenmorphologie von *Agcts2* und dem Wildtyp

Mit Calcofluor (ca) gefärbte Hyphen im Vergleich mit den dazugehörigen Hellfeldaufnahmen (dic) zeigen dichotome Verzweigungen und eine regelmäßige Septierung des Myzels von *Agcts2* und *AgWT*. Größenbalken 40µm.

4.2.4. *Agcts2* zeigt Unterschiede in der Sporenmorphologie

Da *ScCts2* Funktionen bei der Sporulation hat, wurde im Folgenden die Sporenbildung und Sporenmorphologie untersucht. Dazu wurden der *AgWT* und *Agcts2* Stamm in CSM-Flüssigmedium angezogen. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen konnte bei beiden Stämmen die Ausbildung von Asci und Sporen beobachtet werden (Abbildung 18A, B). Die länglichen Sporen in den Asci lagen parallel zueinander und waren in zwei Gruppen aufgeteilt. Diese Gruppen von Sporen waren so zueinander positioniert, dass die Sporenanhänge im Zentrum des Ascus ein Knäuel bildeten. Die umgebende Flüssigkeit der Sporen im Asci des Wildtypes war klar und durchsichtig, wohingegen die Füllung der Sporenbehälter der *cts2*-Mutante durch kleine Partikel getrübt war (Abbildung 18B, C). Nach vollendeter Reifung der Sporen wurden diese freigesetzt. Unterschiede in der Sporenmorphologie konnte bezüglich der Oberflächenstruktur festgestellt werden. Das nadelförmige Erscheinungsbild und die Längen von 25µm bis 35µm der Sporen waren bei den untersuchten Stämmen identisch. Die Sporenwand beim Wildtyp zeigte eine glatte, gleichmäßig strukturierte Oberfläche, während bei der Mutante eine unregelmäßig, reliefartige Oberfläche beobachtet wurde. Sowohl die

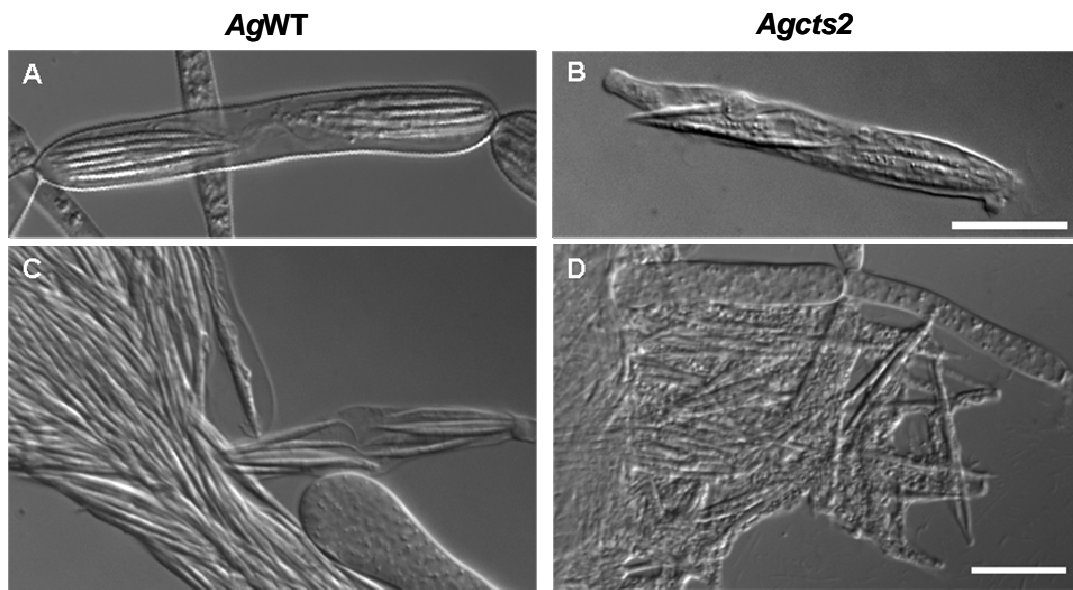


Abbildung 18: Sporenmorphologie von *Agcts2* und *AgWT*

Sporen von *Agcts2* und *AgWT* während der Reifung in Ascus (A, B) und nach der Aggregation der freigesetzten Sporen (C, D). Größenbalken 20µm.

Sporen des Wildtyps als auch der *cts2*-Mutante aggregieren nach der Freisetzung in Flüssigkultur und bilden große Sporenklumpen. Innerhalb der Sporenaggregate des Wildtypstammes waren Einzelsporen gut zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind bei der *cts2*-Mutante nach der Zusammenlagerung der Sporen definierte Einzelsporen schwer zu identifizieren. Unterschiede in der Menge der gebildeten Asci und freigesetzten Sporen konnten nicht festgestellt werden. Abbildung 19 zeigt Sporen von *Agcts2* kurz nach der Freisetzung aus dem Ascus und die beschriebenen reliefartigen Oberflächenstrukturen. Außerdem ist zu erkennen, dass alle Sporen an einem Ende Anhänge tragen, die im Ascus aufgrund der Trübung durch Partikel nicht zu sehen waren. Eine Färbung mit Calcofluor weist Bereiche mit erhöhtem Chitingehalt aus. Damit sind nur Unterschiede in der Oberflächenstruktur, aber nicht in Form, Größe oder dem Vorhandensein von Anhängen festzustellen.

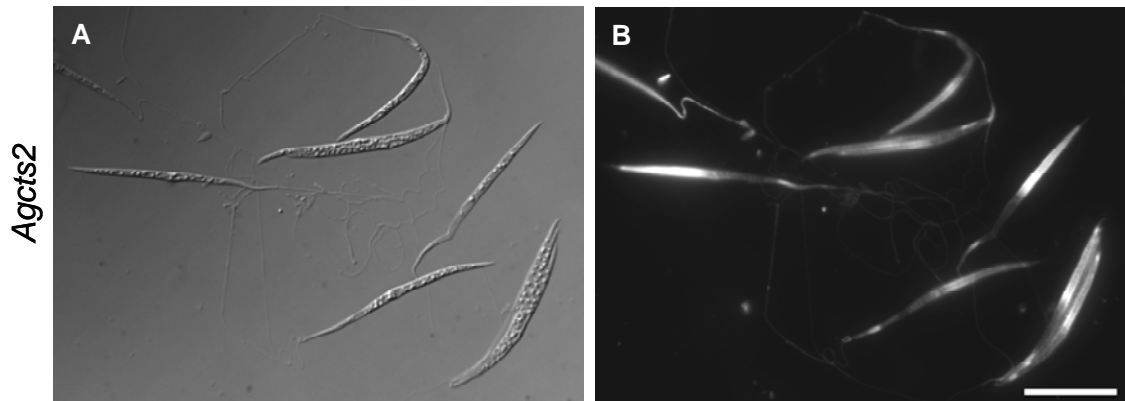


Abbildung 19: Sporenanhänge der *Agcts2*-Mutante

Aus dem Ascus freigesetzten Sporen und deren Anhänge (A). Mit Calcofluor gefärbte Sporen zeigen Bereiche erhöhten Chitidgehalts (B). Größenbalken 20µm.

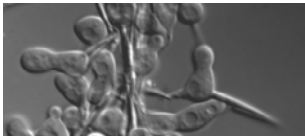
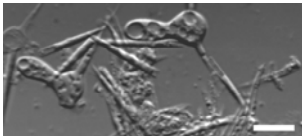
4.2.5. *Agcts2*-Sporen zeigen keine Sensitivität gegenüber Zymolyase und Hitzeschock

Aufgrund der veränderten Oberflächenstruktur der Sporen von *Agcts2* wurde die Sensitivität gegenüber Zymolyase und verschiedenen kurzzeitigen Temperaturerhöhungen getestet. Die Isolierung der Sporen erfolgte wie unter 3.2.2. erläutert durch eine Zymolyasebehandlung. Als Ausgangsvolumen für jeden Test diente 1ml Kultur der für 3 Tage in Minimalmedium angezogenen Stämme. Durch Zugabe von 50µl Zymolyase erfolgte der Abbau der Zellwand des vegetativen Myzels. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden 50µl 10%iges SDS zugegeben, so dass die zuvor hergestellten Sphäroplasten platzten. Zur Kontrolle wurden 100µl einer 10^{-1} Verdünnung der Sporensuspension ausplattiert (n=3), bei 30°C für 2 Tage inkubiert und die Kolonie-bildende-Einheiten (KBE) ausgezählt. Um das Keimungsverhalten der isolierten Sporen nach einem Hitzeschock zu überprüfen, wurden die Sporensuspensionen verschiedenen Temperaturen für 15min ausgesetzt und die gleiche Menge Sporen ausplattiert.

Tabelle 15 vergleicht die Anzahl der ausgekeimten Sporen von *AgWT* und *Agcts2*. Nach der Zymolyase-Behandlung konnten im Falle des Wildtyps durchschnittlich 16 KBE gezählt werden. Die Chitinase-Mutante ist in der Lage keimungsfähige Sporen zu produzieren, da hier 14 Kolonien gezählt wurden. Es konnten keine Unterschiede in der Keimungsfähigkeit der Sporen beider Stämme festgestellt werden. Nach einem

Hitzeschock der Sporensuspension bei 42°C und 50°C sind die Sporen beider Stämme in der Lage auszukeimen. Beim Wildtyp wurden durchschnittlich 12 bzw. 13 und für die Mutante 14 und 11 KBE gezählt. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 65°C für 15min waren weder beim AgWT noch beim *Agcts2*-Stamm Kolonien gewachsen. Die Sporen von *A. gossypii* verlieren ihre Keimungsfähigkeit nach einer Erhitzung im Bereich von 50°C bis 65°C.

Tabelle 15: Vergleich KBE von Wildtyp und *Agcts2*-Sporen nach Hitzeschock und Zymolyase-Behandlung

Stamm			
		AgWT	Agcts2
Zymolyase-Behandlung		16 KBE	14 KBE
Hitzeschock	42°C	12 KBE	14 KBE
	50°C	13 KBE	11 KBE
	65°C	0 KBE	0 KBE

Die Mikroskopaufnahmen zeigen die Keimungsfähigkeit des *Agcts2*-Stammes nach 8h in Flüssigkultur. Größenbalken 10µm.

4.2.6. Morphologischer Vergleich der Sporenkeimung

Für eine Analyse eventueller morphologischer Unterschiede bei der Keimzellenbildung und dem sich anschließendem Hyphenwachstum wurde die Keimung der Sporen der *Agcts2*-Mutante und des *A. gossypii* Wildtyps über einen Zeitraum vom 10h mikroskopisch beobachtet. Durch eine Färbung der keimenden Sporen mit Calcofluor konnten Bereiche erhöhten Chitingehalts sichtbar gemacht werden. Meist sind zwei hellere Region um den Mittelpunkt der nadelförmigen 30µm bis 40µm langen Sporen von *A. gossypii* zu beobachten (Abbildung 20). Nach 1,5h beginnt die Region im Zentrum der Spore zwischen den Bereichen mit erhöhtem Chitingehalt anzuschwellen, es bildet sich eine Keimblase. Im weiteren Verlauf der Sporenkeimung ist zu beobachten, dass die dem Anhang abgekehrte Seite stärker anschwillt. Die Form der Keimzelle nach 2,5h ist einseitig verdickt. Der verdickte Bereich der Keimzelle zeichnet

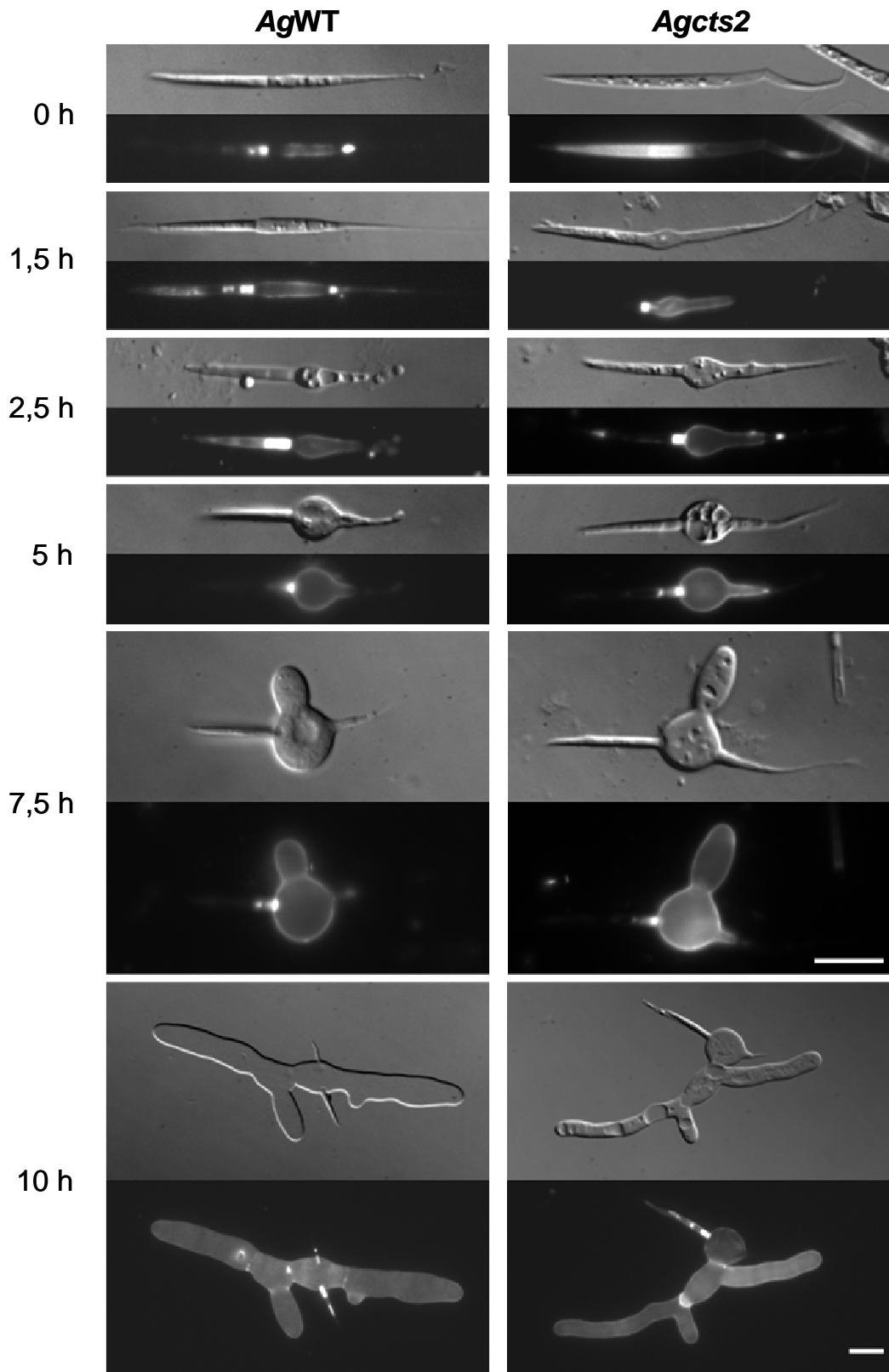


Abbildung 20: Morphologischer Vergleich der Sporenkeimung von *Agcts2* und *AgWT*

Die Sporen der *Agcts2*-Mutante und des Wildtyps wurden in AFM-Medium bei 30°C für 10h inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Calcofluor gefärbt und mikroskopiert. Größenbalken 10µm.

sich im Fortgang durch ein isotropes Wachstum aus, das zur Bildung einer sphärischen Keimblase führt (Abbildung 20, 5h). Die Keimzelle wird zu diesem Zeitpunkt durch die chitinreichen Regionen der Spore begrenzt. Nach 7h bis 8h in Vollmedium bei 30°C wechselt das Wachstum von der isotropen zur polaren Form und führt somit zur Ausbildung der ersten Hyphen. Im Anschluss wird meist eine zweite Hyphe gegenüber der ersten, in einem Winkel von 180° zueinander, ausgebildet. Diese jungen Myzelien zeichnen sich durch laterale Verzweigungen aus. Die Entwicklung der Spore hin zu ersten Myzelien verläuft beim AgWT und der *Agcts2*-Mutante identisch.

4.2.7. *AgCTS2* wird während der Sporulation exprimiert

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Expression von *AgCTS2* entwicklungsabhängig ist und damit das Protein ausschließlich Funktionen während der Sporulation hat. Dazu wurde der Promotor von *AgCTS2* mit dem Reportergen *lacZ* von *Streptococcus thermophilus* fusioniert. Das für die Expressionsstudien verwendete Plasmid pRS *AgCTS2p-lacZ* wurde über mehrere Klonierungsschritte hergestellt (Abbildung 21, Tabelle 5).

Als Ausgangsplasmid diente der Vektor pAU22 der das *StlacZ* trägt, welches durch den *C. albicans* *MAL2*-Promotor und -Terminator flankiert wird. Zunächst wurde der *CaMAL2p* durch den *AgTEFp* ersetzt. Der Austausch erfolgte durch ein *AgTEFp*-PCR-Fragment, das mit den Oligonukleotidprimern 5' *AgTEFpKpnI* und 3' *AgTEFpXhoI* amplifiziert und durch beschriebene Restriktionsschnittstellen in pAU22 ligiert wurde. Nach der Restriktion des entstandenen Plasmid p*AgTEFp-lacZ* mit *KpnI* und *MscI*, wurde ein *AgTEFp-lacZ* Fragment erhalten und dieses pRS416 integriert. Das Plasmid pRS416 *AgTEFp-lacZ* trägt einen *ScURA3*-Marker, mit dem in *A. gossypii* keine Selektion möglich ist. Deshalb wurde ein Markeraustausch über eine homologe Rekombination in Hefe durchgeführt, bei dem ein GEN3-PCR-Produkt (S1 GEN3-pRS, S2 GEN3-pRS) transformiert wurde. Der erhaltene Vektor pRS *AgTEFp-lacZ* besitzt anstelle des *ScURA3* den *GEN3*-Marker. In einem letzten Klonierungsschritt wurde das Plasmid pRS *AgCTS2p-lacZ* hergestellt, bei dem der *AgTEFp* durch den *AgCTS2p* ausgewechselt wurde. Zu diesem Zwecke wurde ein 398bp großes PCR-Fragment von genomischer *A. gossypii*-DNA amplifiziert und der *AgCTS2p* über *KpnI* und *XhoI* vor dem *StlacZ*-Gen integriert.

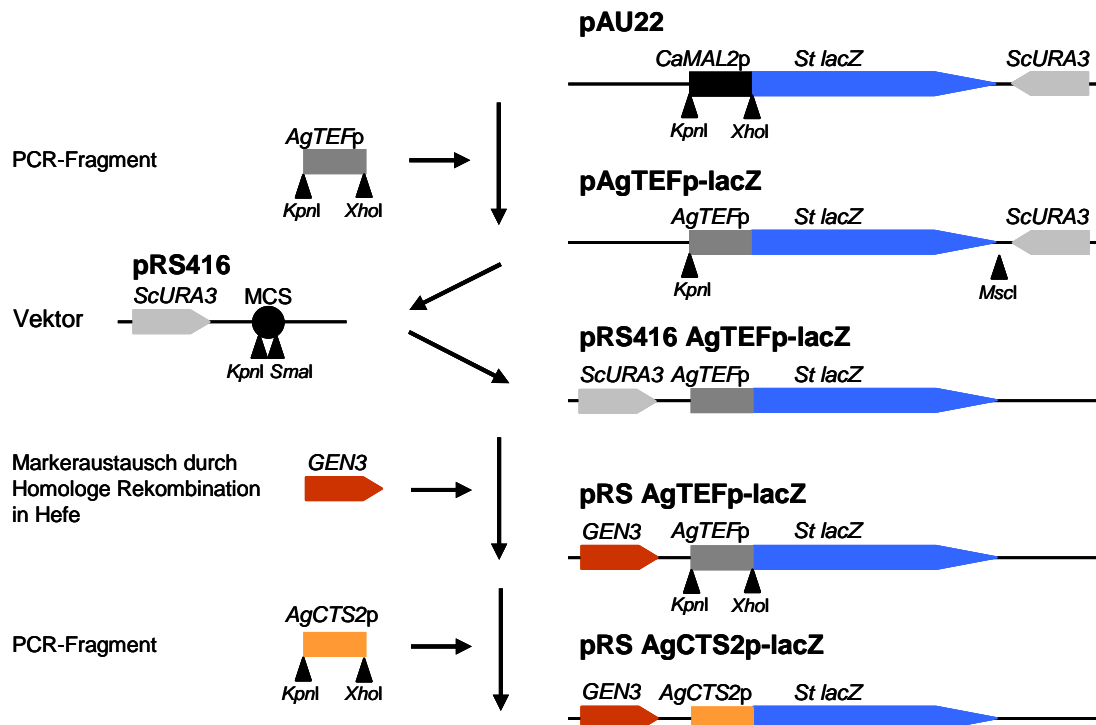


Abbildung 21: Konstruktion der *lacZ*-Fusionsplasmide mit *AgTEFp* und *AgCTS2p*

Die Promotoren von *AgTEF* und *AgCTS2* wurden unter Verwendung des Plasmides *pAU22* mit dem *Streptococcus thermophilus lacZ*-Gen fusioniert. (MCS) Multiple-Klonierungsstelle.

Nach Konstruktion des Plasmides *pRS AgCTS2p-lacZ* wurden dieses und zwei weitere Kontrollplasmide (*pRS AgTEFp-lacZ*, *pRS415 kanMX*) in den *Agleu2*-Stamm transformiert. Für die Analyse der Promotoraktivität von *AgCTS2* wurden AFM-Agarplatten mit kleinen Myzelstücken der Plasmidtransformanten beimpft und für 5 Tage bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte das Aufsprühen von X-GAL-Lösung. Unter den getesteten Kolonien konnte bei denjenigen Stämmen eine Blaufärbung beobachtet werden, die das *StlacZ*-Gen auf ihrem Plasmid trugen. Der Stamm mit *pRS415 kanMX* zeigte keine Verfärbung und blieb wie erwartet weiß (Abbildung 22). Eine Expression des *StlacZ* durch den *AgTEF*-Promotor führte zu einer starken Blaufärbung, die gleichmäßig über die gesamte Kolonie verteilt war. Bei einer *lacZ*-Expression durch den *AgCTS2p* war keine gleichmäßige Kolorierung über die gesamte Kolonie zu beobachten, sondern nur eine Blaufärbung im Zentrum. Außerdem war die Intensität der Färbung schwächer als beim *pRS AgTEFp-lacZ*, was auf eine niedrigere Expressionsrate durch den *AgCTS2p* schließen lässt. Die Expression des *CTS2p-lacZ* Konstruktes in Zentrum der Kolonie entspricht den Bereichen der Kolonie, in der Sporen gebildet werden.

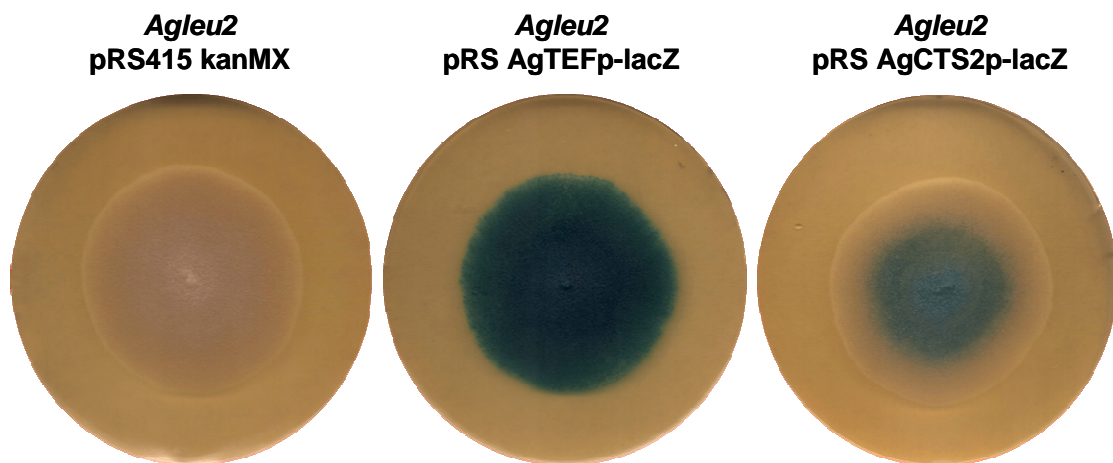


Abbildung 22: Expression des *lacZ*-Gens unter Kontrolle des *AgCTS2*-Promotors

Myzelstücke der dargestellten Plasmidtransformanten wurden auf AFM-Platten ausgebracht und für 5 Tage bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte das Aufsprühen von jeweils 100µl X-GAL-Lösung (20mg/ml in *N,N*-Dimethylformamid).

4.2.8. Komplementierung der *A. gossypii* *cts2*-Mutante durch *ScCTS2* und *CaCHT4*

Der Proteinvergleich der Chitinasen von *A. gossypii*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* hat gezeigt, dass *AgCTS2*, *ScCTS2* und *CaCHT4* zur Gruppe der sporulations-spezifischen Chitinasen gehören und die katalytischen Domänen konserviert sind (Abbildung 23). Um die Funktionshomologie dieser Chitinasen zu beweisen, sollte die Fähigkeit zur Komplementierung des *cts2*-Defekts in *A. gossypii* durch *ScCTS2* und *CaCHT4* untersucht werden. Zunächst wurde jedoch das *AgCTS2*-Gen von genomischer DNA amplifiziert und über die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *SacI* in den Vektor pRS AgTEFp-lacZ integriert um eine endogene Komplementierung des *Agcts2*-Defekts zu erreichen. Für eine heterologe Expression von *ScCTS2* und *CaCHT4* in *A. gossypii* wurden die offenen Leserahmen und die sich anschließenden Terminatorregionen der beiden Gene über PCR amplifiziert. Die Integration der PCR-Fragmente erfolgte an die Stelle des *lacZ*-Gens im Plasmid pRS AgTEFp-lacZ durch eine Restriktion mit *XhoI* und *SacII*. Die ORFs der Chitinasen in den entstandenen Plasmiden pRS AgTEFp-*ScCTS2* und pRS AgTEFp-*CaCHT4* wurden durch den konstitutiv-aktiven Promotor des *AgTEF1*-Gens exprimiert. Für eine gezielte Expression von

ScCTS2 und *CaCHT4* während der Sporulation wurden die erwähnten PCR-Fragmente hinter den *AgCTS2*-Promotor im Vektor pRS *AgCTS2p-lacZ* kloniert. Die entstandenen Plasmide pRS *AgCTS2p-ScCTS2* und pRS *AgCTS2p-CaCHT4*, sowie alle weiteren beschriebenen Konstrukte wurden in den *Agcts2::LEU2*-Stamm transformiert.

Bei dem aus der Transformation der *Agcts2*-Mutante mit pRS *AgCTS2* entstandenem Stamm ADA22 wurde durch die Inkubation in Minimalmedium die Sporulation induziert. Die ausgebildeten Asci zeichneten sich durch eine klare, durchsichtige Füllung aus und die freigesetzten Sporen zeigten eine glatte, gleichmäßig strukturierte Oberfläche (Abbildung 23, B). Die *cts2*-Mutante ohne das *AgCTS2*-Gen hingegen, ist durch eine reliefartige Oberflächenstruktur der Sporen und durch eine partikel-getrübte Füllung der Asci gekennzeichnet (Abbildung 23, A). Das auf dem Vektor lokalisierte *AgCTS2*-Gen ist in der Lage den *AgCTS2*-Defekt aufzuheben und führt zu wildtypartigen Sporen. Eine heterologe Expression von *ScCTS2* und *CaCHT4* durch den konstitutiv-aktiven *AgTEF*-Promotor in den Plasmidtransformanten ADA23 und ADA25 führt ebenfalls zur Aufhebung des Mutanten-Phänotyps (Abbildung 23; C, D). Wurde die Expression der sporulations-spezifischen Chitinasen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* durch den *AgCTS2*-Promotor kontrolliert, kann es zur Ausbildung von Sporen mit ebenmäßigen Oberflächen und durchscheinenden Asci, vergleichbar mit dem Wildtyp-Stamm und der Komplementierung durch die Plasmide pRS *AgCTS2*, pRS *AgCTS2p-ScCTS2* und pRS *AgCTS2p-CaCHT4*. Eine Aufhebung des *AgCTS2*-Defekts mit *ScCTS2* und *CaCHT4* ist sowohl durch eine Expression mit dem *AgTEFp* als auch mit dem während der Sporulation aktiven Promotor von *AgCTS2* möglich.

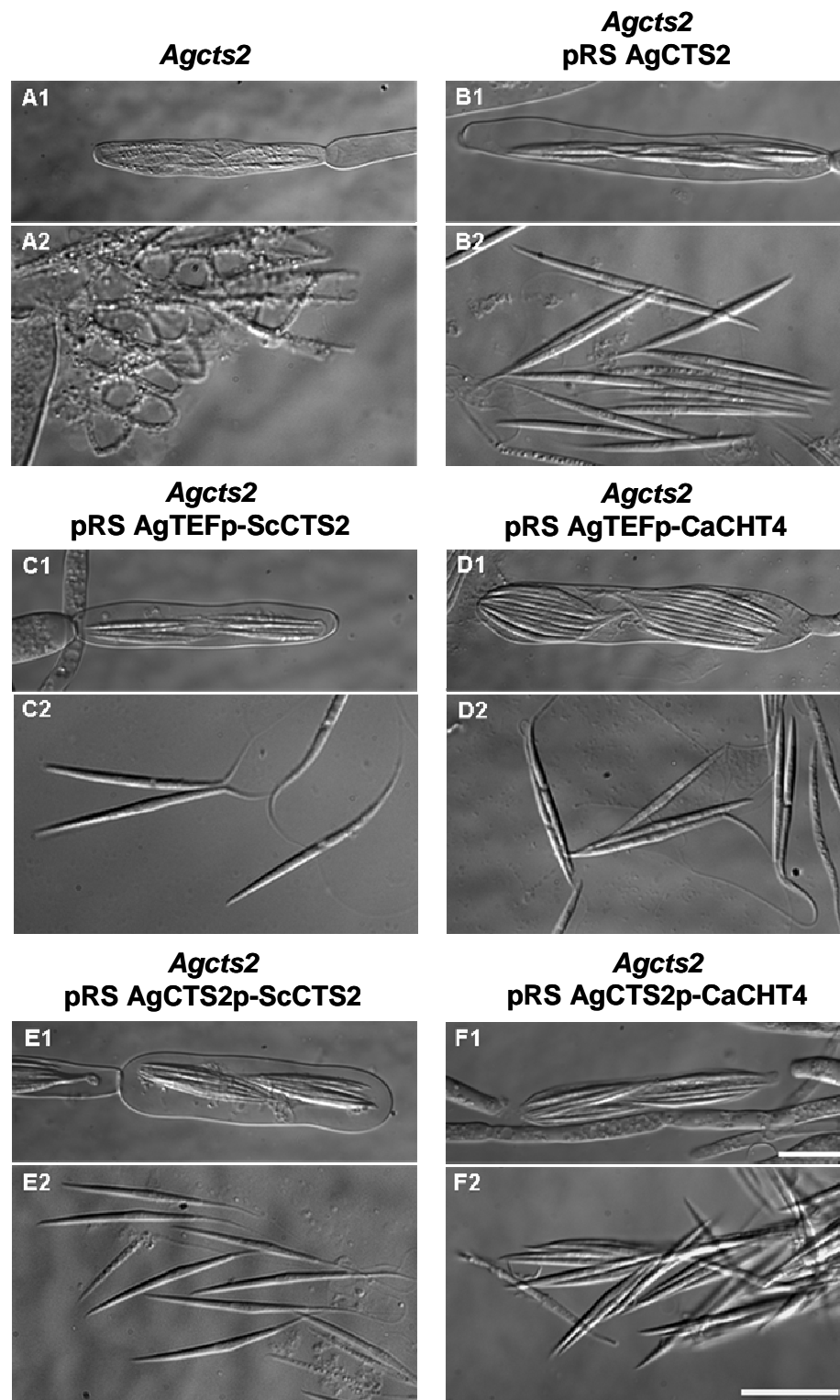


Abbildung 23: Komplementierung des *Agcts2*-Defekts durch *ScCTS2* und *CaCHT4*

Aufnahmen von Asci und freigesetzten Sporen der Stämme ADA19 (A1, A2), ADA22 (B1, B2), ADA23 (C1, C2), ADA25 (D1, D2), ADA24 (E1, E2) und ADA26 (F1, F2) nach einer Inkubation bei 30°C für 3 Tage im CSM-Medium. Größenbalken 20µm

4.2.9. Deletionsmutanten von *CHT4* in *C. albicans* zeigen keine Defekte bei der Chlamydosporenbildung

Im Genom von *C. albicans* wurden die Chitinase-Gene *CHT1*, *CHT2*, *CHT3* und *CHT4* identifiziert (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/index.html>). *CaCHT4* gruppiert sich auf Grund seiner Domänenstruktur zur Gruppe der sporulations-spezifischen Chitinasen, zusammen mit der einzigen Chitinase *CTS2* in *A. gossypii*. *CaCHT1*, *CaCHT2* und *CaCHT3* gehören zur Gruppe der Exo- und Endochitinasen. Die Deletion von *CaCHT3* resultiert in einem Zytokinesedefekt, während bei den *Cacht1*, *Cacht2* und *Cacht4*-Mutanten keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden konnten (DÜNKLER et al., 2005).

Chlamydosporen sind dickwandige, asexuelle Sporen mit einer runden Gestalt, die unter semi-aeroben Bedingungen von Hyphenzellen gebildet werden (KREGER-VAN RIJ, 1984; ODDS, 1988). Aufgrund der Zugehörigkeit von *CaCHT4* zur Gruppe der sporulations-spezifischen Chitinasen, wurde die Chlamydosporenbildung der *Cacht4*-Mutante untersucht. Dafür wurden neben der *Cacht4*-Mutante auch die anderen Chitinase-Mutanten auf Maismehlagar aufgebracht und nach Auflage eines Deckglases für mindestens 5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chlamydosporen des Wildtyps SC5314 werden von Trägerhyphen am Ende von pseudohyphalen Elementen gebildet. Die Sporen sind oval bis rund und 3 bis 4 mal größer als Zellen in der Hefephase. Es ist zu beobachten, dass ein dichtes Netz aus Hyphen gebildet wird, entlang derer es zur Bildung der asexuellen Sporen kommt. Das Fehlen der Chitinasen *CHT1*, *CHT2* und *CHT3* hat keine Auswirkungen auf die Bildung von Chlamydosporen (Abbildung 24). Die Mutanten bilden ein Hyphennetz aus und an den Enden der Trägerhyphen können Chlamydosporen beobachtet werden. Das Fehlen der sporulations-spezifischen Chitinasen *CHT4* hat ebenfalls keine Effekte auf die Chlamydosporenbildung. Morphologisch sind keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *Cacht4* festzustellen.

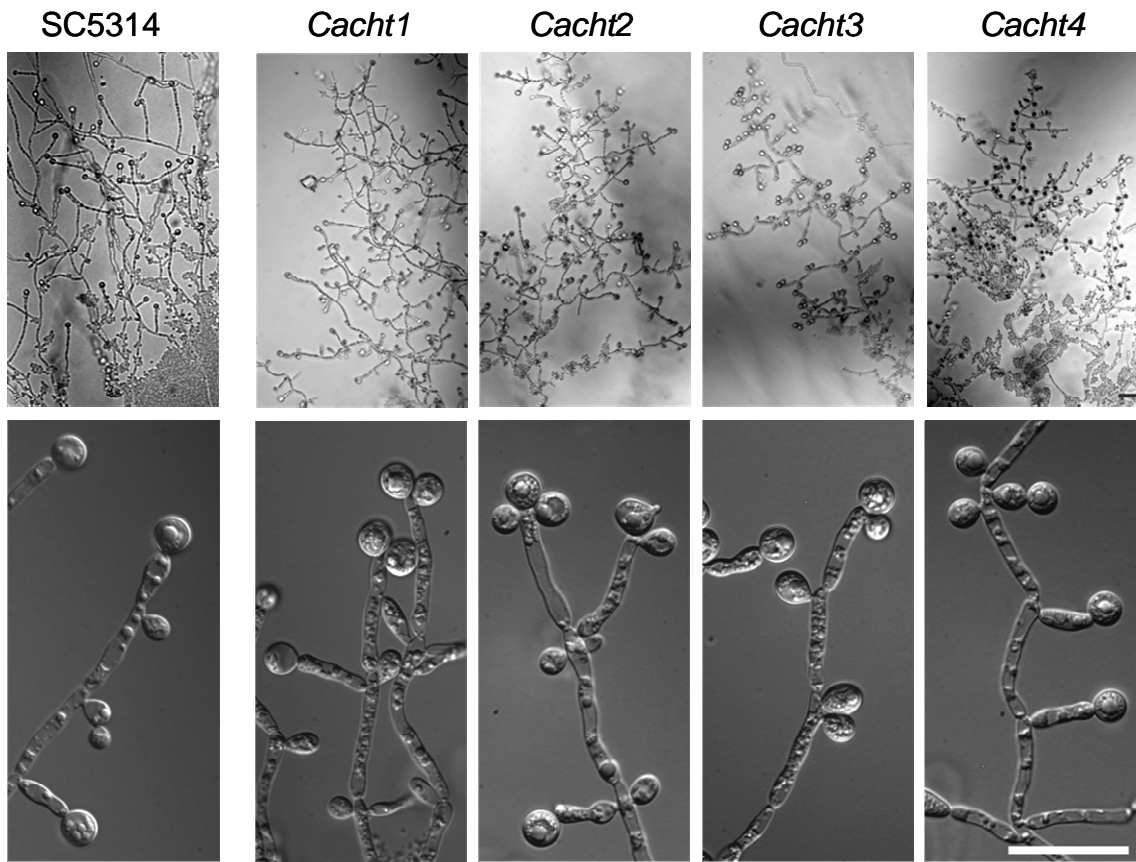


Abbildung 24: Chlamydosporenbildung der Chitinase-Mutanten von *C. albicans*

Die Mutanten *Cacht1*, *Cacht2*, *Cacht3* und *Cacht4* wurden auf Maismehlagar unter semi-aeroben Bedingungen für 5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Alle untersuchten Mutanten sind in der Lage Chlamydosporen auszubilden. Größenbalken 30µm

4.3. Regulation des *MET3*-Promotors in *A. gossypii* und *S. cerevisiae*

4.3.1. Sequenzvergleich des *MET3*-Promotors von *A. gossypii* und *S. cerevisiae*

Das *S. cerevisiae* *MET3*-Gen kodiert für eine ATP-Sulfat-Adenyltransferase, ein Enzym in der Methionin-Biosynthese. Die physiologische Expression dieses Enzyms wird beim Vorhandensein von Methionin im Kulturmedium reprimiert (CHEREST et al., 1985). Durch die Regulierbarkeit des *ScMET3*-Promotors, ist dieser zu einem nützlichen Werkzeug bei der Untersuchung von Genfunktionen in *S. cerevisiae* geworden (BLACK et al., 1995; FULLER et al., 1998). In der Genomsequenz von *A. gossypii* konnte ein Homolog zum *ScMET3*-Gen identifiziert werden, *AgMET3* (<http://agd.unibas.ch/>).

Im Promotor von *ScMET3* befinden sich zwei kurze Nukleotidsequenzen, die eine identische, palindromische Basenabfolge CACGTG haben. Dieser Sequenzbereich stellt Bindestellen für ScCbf1 dar und wird als CDEI (centromer DNA element I) bezeichnet. Cbf1 ist zusammen mit anderen Proteinen an der Transkription und Regulation des *ScMET3*-Gens beteiligt (BLAISEAU and THOMAS, 1998). Bei der Sequenzanalyse des *MET3*-Promotors in *A. gossypii* wurden ebenfalls zwei Cbf1-Bindestellen mit der Konsensussequenz CACRTG identifiziert (Abbildung 25). Die Cbf1-Bindestellen befinden sich 202 und 168 Nukleotide aufwärts vom Startkodon des *AgMET3*-ORFs. Die beiden CACRTG Sequenzen liegen in einem Abstand von 28 Basen zueinander. Im Promotor von *ScMET3* ist der Abstand zwischen den beiden CACGTG-Sequenzen 11 Nukleotide groß und damit geringer als in *A. gossypii*. Die Position der Cbf1-Bindestellen im Promotor ist 377 und 360 Basenpaare aufwärts vom Transkriptionsstart. In *S. cerevisiae* ist die Sequenz beider Kopien CACGTG. In *A. gossypii* unterscheiden sich die beiden Cbf1-Bindestellen in ihrer Nukleotidsequenz, wobei beide der Konsensussequenz CACRTG entsprechen. Die Promotoren der *MET3*-Gene zeigen keinerlei Sequenzhomologien, bis auf die erwähnten Cbf1-Bindestellen und den TATA-Boxen für den Transkriptionsstart.

Die zentromere DNA der einzelnen *S. cerevisiae* Chromosomen besitzt wie der Promotor des *MET3*-Gens CDEI-Elemente. Die Bindung von Cbf1 an die Sequenzbereiche CACGTG und CACATG in der Zentromerregion ist für den Aufbau des Kinetochors bei der Kernteilung entscheidend.

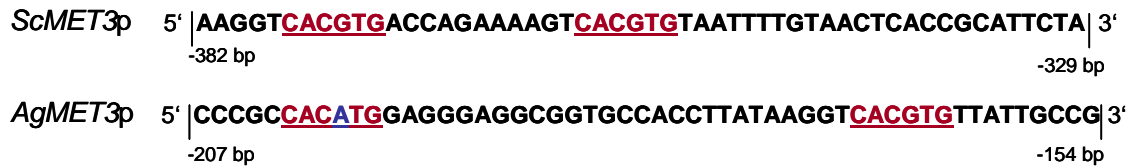


Abbildung 25: Cbfl-Bindestellen in den Promotorsequenzen von *AgMET3* und *ScMET3*

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus der Nukleotidsequenz der Promotoren des *AgMET3* und *ScMET3*-Gens. Die Angaben der Basenpaare (bp) bezeichnen den Abstand zum Adenosin des Startkodons des jeweiligen Gens. Die Konsensussequenz CACRTG ist in *S. cerevisiae* die Bindestelle für Cbfl, der zusammen mit anderen Proteinen für die Transkription von *ScMET3* verantwortlich ist.

4.3.2. Expressionsanalyse des *lacZ*-Gens unter Kontrolle des *AgMET3p* und *ScMET3p*

Die Expressionsanalyse der *MET3*-Promotoren von *A. gossypii* und *S. cerevisiae* erfolgte durch eine Fusion mit dem *lacZ* von *Streptococcus thermophilus*. Für die Fusion der *MET3*-Promotoren mit dem *lacZ*-Reportergen diente der unter 4.2.7 beschriebene Vektor pRS AgTEFp-*lacZ* als Ausgangsplasmid. Von genomischer DNA wurde ein 269bp großes *AgMET3p*-Fragment mit den Primern 5'*AgMET3p*-KpnI und 3'*AgMET3p*-XhoI amplifiziert. Durch die in den Primern eingebauten Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XhoI* konnte der *AgMET3p* anstelle des *AgTEFp* im Vektor pRS AgTEFp-*lacZ* integriert werden. Um den *MET3p* von *S. cerevisiae* mit dem *lacZ* zu fusionieren, wurde ein 547bp langes PCR-Fragment, unter Verwendung der Primer 5'*ScMET3p*-KpnI und 3'*ScMET3p*-SalI mit den Schnittstellen *KpnI* und *SalI*, amplifiziert. Das geschnittene Promotor-Fragment wurde in den durch *KpnI* und *XhoI* linearisierten pRS AgTEFp-*lacZ* integriert. Die entstandenen Vektoren pRS *AgMET3p*-*lacZ* und pRS *ScMET3p*-*lacZ* wurden für Expressionstudien in *A. gossypii* und *S. cerevisiae* verwendet.

Die *MET3*-Gene liegen im Biosyntheseweg für Methionin und Cystein. Die Abschaltung des *ScMET3p* erfolgt durch Zugabe von Methionin, während in *C. albicans* Methionin und Cystein zugegeben werden müssen. Die Aminosäure Cystein wirkt in höheren Konzentrationen zytotoxisch. Deshalb wurde vor den Expressionsstudien die maximale Cystein-Konzentration in *A. gossypii*-Kulturen

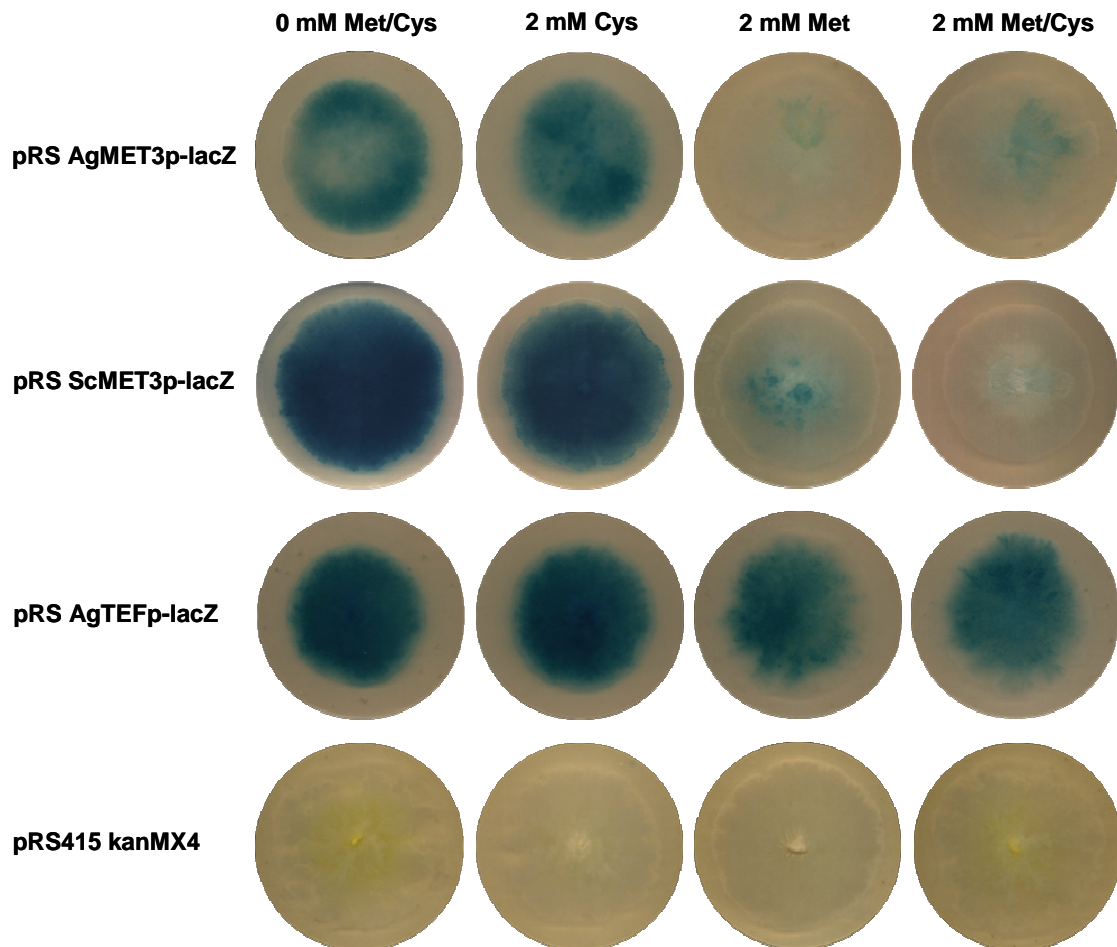


Abbildung 26: Untersuchung der Regulierbarkeit des *AgMET3p* und *ScMET3p* in *A. gossypii* mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens

Die angegebenen Plasmide wurden in den *Agleu2* Stamm transformiert. 2xCSM-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Methionin (Met) und Cystein (Cys) wurden mit den erhaltenen Transformanten beimpft und für 6 Tage bei 30°C inkubiert. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde durch Besprühen der Kolonien mit X-GAL sichtbar gemacht. Die *MET3*-Promotoren von *S. cerevisiae* und *A. gossypii* lassen sich durch die Zugabe von 2mM Methionin abschalten.

bestimmt. Der Wildtyp wächst in CSM-Flüssigmedium bis zu einer Konzentration von 2,5mM Cystein. Die Zugabe von Methionin hatte keinen Einfluss auf das Wachstum. Bei allen getesteten Methionin-Konzentrationen bis 10mM wuchs der Wildtyp von *A. gossypii* in den Kulturkolben gleichmäßig gut. Um die Regulierbarkeit des *AgMET3p* und *ScMET3p* in *A. gossypii* zu testen, wurden die Plasmide pRS *AgMET3p-lacZ* und pRS *ScMET3p-lacZ*; sowie die zwei Kontrollplasmid pRS *AgTEFp-lacZ* und pRS415 *kanMX4* in den *Agleu2*-Stamm transformiert. Mit Myzelstücken der erhaltenen Plasmidtransformanten ADA2, ADA3, ADA4 und ADA11 wurden CSM-Agarplatten

mit 2mM Cystein, 2mM Methionin, 2mM Methionin und Cystein, sowie Agarplatten ohne diese beiden Aminosäuren angeimpft und für 6 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 100µl X-GAL besprüht, um das Expressionslevel der getesteten Promotoren unter den verschiedenen Bedingungen anhand der β -Galaktosidase-Aktivität sichtbar zu machen. Der Stamm ADA4 mit pRS AgMET3p-lacZ zeigt auf den CSM-Platten ohne Methionin und Cystein eine Blaufärbung, die auf eine Expression des *lacZ*-Gens unter diesen Bedingungen hinweist (Abbildung 26). Auch das Wachstum dieses Stammes auf CSM-Medium mit 2mM Cystein führt nach der X-GAL Behandlung zu einer Blauverfärbung. Bei der Anwesenheit von 2mM Methionin, sowie 2mM Methionin und Cystein wird eine nur sehr schwache Verfärbung der Kolonien sichtbar. Der Stamm ADA3 bei dem das *lacZ* durch den *ScMET3p* kontrolliert wird, zeigt ein identisches Färbungsmuster bei den unterschiedlichen Konzentrationen von Methionin und Cystein. Das Fehlen von Methionin im Kulturmedium führt zu einer Blaufärbung der Kolonie, bei Anwesenheit von Methionin bleibt die Kolonie weiß, weil der *ScMET3p* reprimiert wurde. Die Zugabe von Cystein hat bei keinem der beiden untersuchten *MET3p* einen Einfluss auf die β -Galaktosidase-Aktivität. Nur durch die Zugabe von 2mM Methionin können die Promotoren ausgeschaltet werden. Eine Expression durch den Promotor des *AgTEF1*-Gen von *A. gossypii* führt zu einer konstitutiv-aktiven Transkription. Die Kolonien des Stammes ADA2 mit dem pRS AgTEFp-lacZ zeigen unabhängig von den gewählten Konzentrationen der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren eine gleichmäßig starke Blaufärbung. Die Kolonien des Kontrollstammes mit pRS415 kanMX4 bleiben nach dem Aufbringen von X-GAL weiß.

Für die Untersuchung einer heterologen Expression des *AgMET3p* in *S. cerevisiae* wurde das Plasmide pRS AgMET3p-lacZ in den Stamm BY4743 transformiert. Neben diesem Plasmid wurden auch die anderen zuvor in *A. gossypii* verwendeten Plasmid transformiert und getestet. Die Stämme YAD146 (pRS415 kanMX), YAD128 (pRS AgTEFp-lacZ), YAD129 (pRS ScMET3p-lacZ) und YAD130 (pRS AgMET3p-lacZ) wurden in SD-Medium angezogen und auf gepufferten SD-Platten, die X-GAL enthielten, aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 30°C zeigte der Stamm YAD129 ohne Methionin und Cystein eine Blaufärbung (Abbildung 27). Bei einer Konzentration von 2,5mM Methionin wurde die Expression des *ScMET3p* reprimiert und die Zellen blieben weiß. Die Kontrolle des *lacZ* durch den

AgMET3p in Stamm YAD130 führt bei Abwesenheit von Methionin zu einer starken Verfärbung, wird Methionin zugegeben, wird die Blaufärbung jedoch nur geringfügig schwächer. Damit zeigen der *ScMET3p* und *AgMET3p* Unterschiede in ihrer Regulierbarkeit in *S. cerevisiae*. Der *AgMET3p* kann in Hefe nicht vollständig reprimiert werden. Die Expression von *lacZ* durch den *AgTEFp* führt bei allen getesteten Bedingungen zu einer gleichmäßig starken Blauverfärbung. Der Kontrollstamm YAD101 blieb weiß.

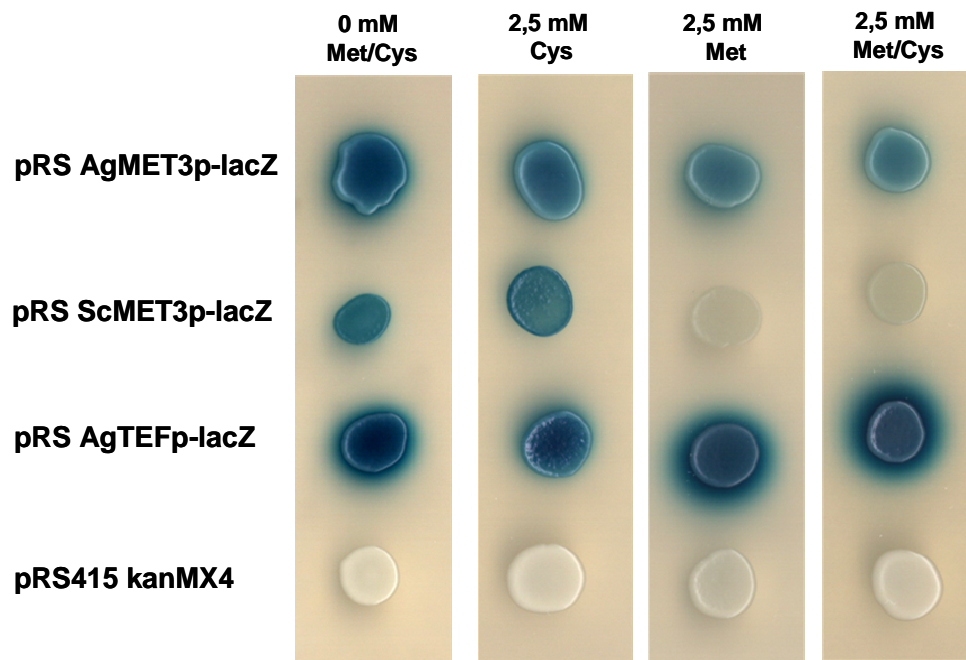


Abbildung 27: Untersuchung der Regulierbarkeit des *AgMET3p* und *ScMET3p* in *S. cerevisiae* mit Hilfe des *lacZ*-Reportergens

Die angegebenen Plasmide wurden in den Hefestamm BY4743 transformiert. Die Transformanten wurden auf gepufferte SD-Platten, die X-GAL enthielten, getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Konzentrationen an Methionin (Met) und Cystein (Cys) wurde wie dargestellt gewählt. Der *AgMET3p* kann nicht wie der *ScMET3p* durch Zugabe von 2,5mM Methionin reprimiert werden.

4.3.3. Untersuchung der Regulierbarkeit des *AgMET3p*-GFP und *ScMET3p*-GFP durch Intensitätsmessungen

Um den zeitlichen Verlauf der Regulation des *AgMET3p* und *ScMET3p* untersuchen zu können, wurden diese Promotoren mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. Dazu wurde das GFP^{S65T} verwendet, bei dem die Aminosäure Serin in

Position 65 des Proteins durch Threonin ersetzt wurde. Zunächst erfolgte die Amplifikation des 714bp großen GFP-ORFs vom Plasmid pGUG mit den Primern 5'GFP(S65T)-SalI und 3'GFP(S65T)-SacII. Die verwendeten Primer enthielten in ihrer Sequenz die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *SacII*. Das verdaute PCR-Fragment wurde in die durch *SalI* und *SacII* linearisierten Vektoren pRS AgMET3p-lacZ, pRS ScMET3p-lacZ und pRS AgTEFp-lacZ ligiert. Nach dem Austausch des *lacZ* durch den *GFP*-ORF, wurden die erhaltenen Plasmide pRS AgMET3p-GFP, pRS ScMET3p-GFP und pRS AgTEFp-GFP in den *AgΔleu2*-Stamm und in den *S. cerevisiae*-Stamm BY4743 transformiert.

Für die Intensitätsmessungen des GFPs unter Kontrolle der *MET3*-Promotoren, wurden alle Stämme von *A. gossypii* und *S. cerevisiae* in 2xCSM ohne Methionin bei 30°C angezogen. Zu Beginn der Messungen wurde das Myzel oder die Hefezellen verdünnt und 2mM bzw. 2,5mM Methionin zur Testkultur zugegeben. Die Intensität des zytosolischen GFP-Leuchtens korreliert mit dem Expressionslevel des jeweiligen Promotors. Mit Hilfe der Software für die Bildbearbeitung, Metamorph Version 4.6, war eine vergleichende Intensitätsmessung der Fluoreszenz möglich. Zu Beginn des Versuches wurde für den *AgMET3p* in *A. gossypii* eine GFP-Intensität von 4400 und für den *ScMET3p* 4350 gemessen (Abbildung 28). Für den *AgTEFp* wurde eine Intensität von 6100 gemessen. Das Expressionslevel des *AgMET3p* und *ScMET3p* ist ähnlich, liegt jedoch ein Drittel niedriger als das des *AgTEF*-Promotors. Nach der Zugabe von 2mM Methionin wurde die GFP-Intensität über einen Zeitraum von 10h zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die gemessenen Intensitäten für den *AgMET3p* nehmen bis 2h nach der Methionin-Zugabe auf 1600 stark ab und erreichen nach 10h den GFP-Wert des Kontrollplasmides pRS145 kanMX4 von durchschnittlich 500. Die Verlaufskurve der Messwerte für den *ScMET3p* ist der des *AgMET3p* sehr ähnlich. Nach 2h reduziert sich die GFP-Intensität um 2800 auf 1550. Die Expression des *AgTEFp* wird durch die Zugabe von Methionin nicht beeinflusst, die Intensität ist gleich bleibend bei ca. 6300. Die Intensitätsmessungen in *A. gossypii* zeigen, dass durch Zugabe von Methionin das Expressionslevel des GFP durch den *AgMET3p* und *ScMET3p* deutlich reduziert wird.

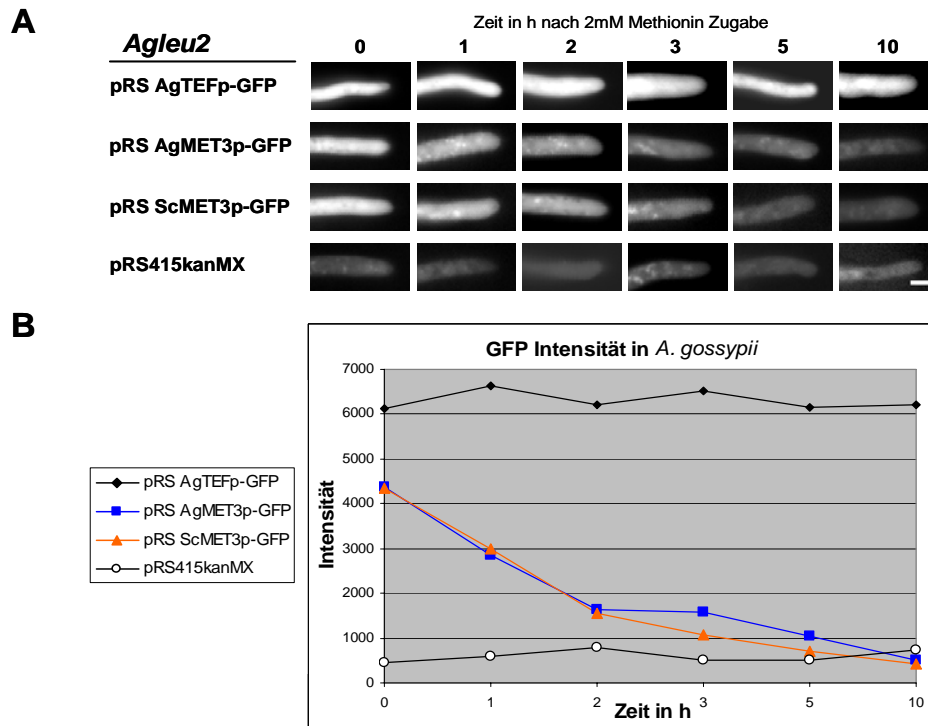


Abbildung 28: GFP-Intensitätsmessungen in *A. gossypii* bei kontrollierter Expression durch den *AgMET3p* und *ScMET3p*

Die dargestellten Plasmidtransformanten in *A. gossypii* wurden in 2xCSM-Medium angezogen und in dem gleichen Medium verdünnt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 2mM Methionin wurde anhand mikroskopischer Bilder (A) die zytosolische GFP-Intensität unter Verwendung der Software Metamorph Version 4.6, bestimmt. Für jeden Zeitpunkt und Stamm wurden zwischen 100 und 200 Messungen gemacht und die Durchschnittswerte der Intensitäten graphisch aufgearbeitet (B). Bereits 2h nach Zugabe von Methionin erfolgt eine starke Abnahme der Intensitäten der *A. gossypii* Stämme mit den Plasmiden pRS AgMET3p-GFP und pRS ScMET3p-GFP, die schließlich die Messwerte des Kontrollplasmides pRS415 kanMX erreichen. Die Expression durch den *AgTEFp* wird durch Methionin-Zugabe nicht beeinflusst. Größenbalken 5µm.

Mit denselben Expressionsplasmiden wurde die Intensität des GFPs im *S. cerevisiae*-Stamm BY4743 bestimmt. Die Versuchsbedingungen und das Kulturmedium waren identisch, nur die Menge des zugegebenen Methionins betrug 2,5mM. Für den *AgTEFp* wurde über einen Zeitraum von 10h eine GFP-Intensität von durchschnittlich 6300 gemessen, was mit den gemessenen Werten in *A. gossypii* übereinstimmt (Abbildung 29). Die Intensität des *AgMET3p* beträgt zu Beginn des Versuches 4800 und sinkt nach 5h auf einen Wert von 1000. Auch nach 10h konnte der durchschnittliche Wert des Kontrollplasmides von 250 nicht erreicht werden. Wie in *A. gossypii* beobachtet, wird die Expression des *ScMET3p* durch Methionin reprimiert und die Intensität nimmt innerhalb der ersten 3h stark ab und erreicht am Ende eine Intensität von 500.

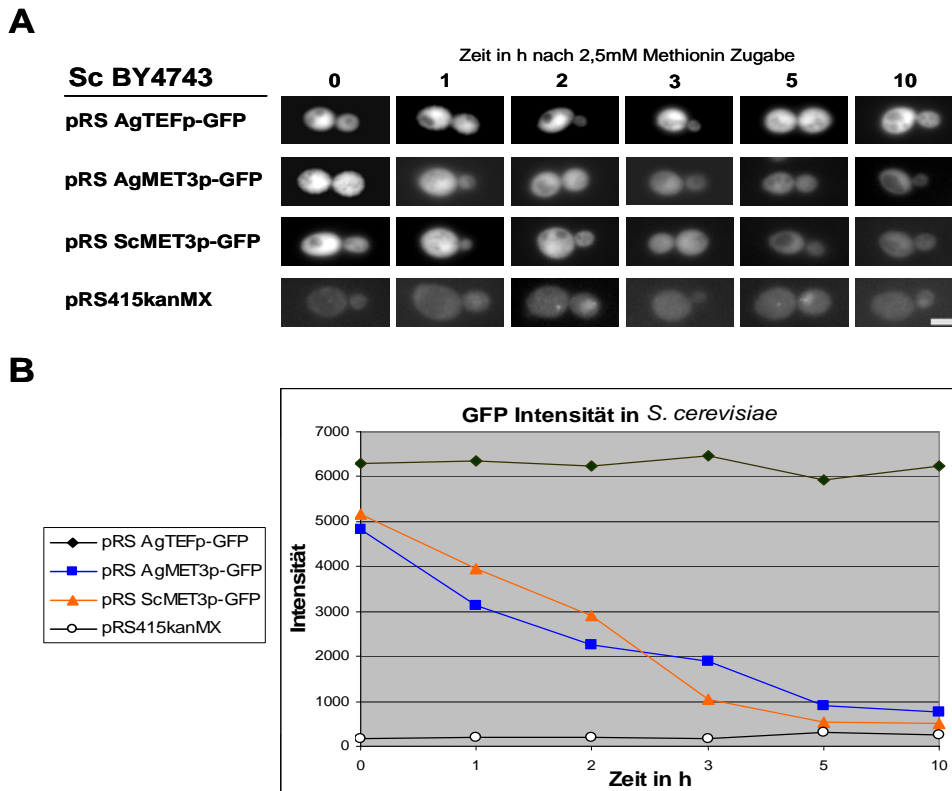


Abbildung 29: GFP-Intensitätsmessungen in *S. cerevisiae* bei kontrollierter Expression durch den *AgMET3p* und *ScMET3p*

Die dargestellten Plasmidtransformanten in *S. cerevisiae* BY4743 wurden in 2xCSM-Medium angezogen und im gleichen Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 verdünnt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 2,5mM Methionin wurde anhand mikroskopischer Bilder (A) die zytosolischen GFP-Intensitäten unter Verwendung der Software Metamorph Version 4.6, bestimmt. Für jeden Zeitpunkt und Stamm wurden zwischen 100 und 200 Messungen gemacht und die Durchschnittswerte der Intensitäten graphisch aufgearbeitet (B). Durch die Zugabe von Methionin erfolgt eine Abnahme der Intensitäten der *S. cerevisiae*-Stämme mit den Plasmiden pRS AgMET3p-GFP und pRS ScMET3p-GFP. Die Expression durch den *AgTEFp* wird durch Methionin-Zugabe nicht beeinflusst. Größenbalken 5µm.

4.3.4. Regulierbare Expression von *AgCYK1* durch den *AgMET3p*

In *A. gossypii* erfolgt die Kompartimentierung der Hyphen durch die Ausbildung von Septen. *AgCYK1* ist an der Bildung des kontraktiven Aktinringes beteiligt, der die Bildung von Septen durch nachfolgende Chitineinlagerungen initiiert. Durch eine Disruption von *AgCYK1*, ist diese Mutante nicht mehr fähig einen Aktinring zu bilden und Chitin an den Septierungsstellen zu akkumulieren. Die Komplementierung der Mutante und die Lokalisierung des Proteins wurden durch die Transformation von pLEU2-CYK1-GFP in *Agcyk1* gezeigt (WENDLAND and PHILIPPSEN, 2002).

Für eine gezielte Expression von *CYK1-GFP* wurde der endogene Promotor gegen den *AgMET3p* ausgetauscht. Ein 2181bp-Fragment wurde durch PCR mit den Primern S1-MET3p-CYK1 und S2-AgMET3p-CYK1 von pFA-GEN3-AgMET3p generiert. Die genutzten Primer enthielten Homologieregionen zum pLEU2-CYK1-GFP, die eine exakte Integration des GEN3-AgMET3p-Fragments durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* vor den *AgCYK1*-ORF ermöglichten. Anschließend wurde der *GEN3*-Marker aus pAgMET3p-CYK1-GFP-GEN3 durch eine Restriktion mit *Bam*HI entfernt und an dessen Stelle ein *Bgl*II geschnittenes NATMX3-Fragment integriert. Das entstandene Plasmid pAgMET3p-CYK1-GFP-NATMX3 wurde in den *Agcyk1*-Stamm transformiert und die Regulierbarkeit durch den *AgMET3p* im Stamm ADA20 untersucht.

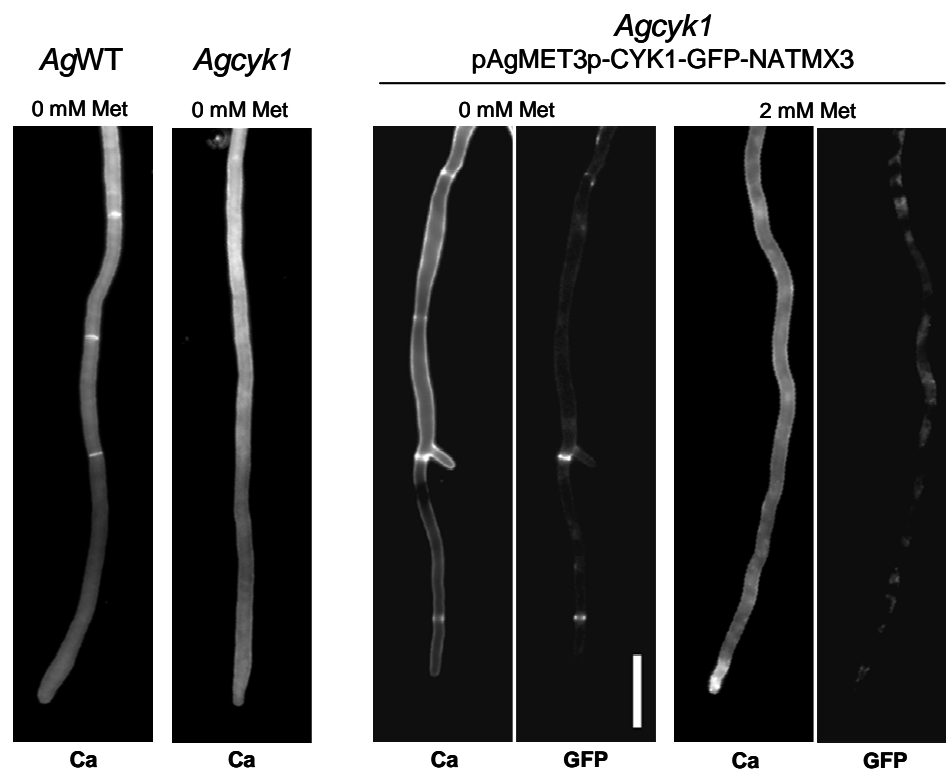


Abbildung 30: Regulierbare Expression von *AgMET3p-AgCYK1* in der *Agcyk1*-Mutante

Die Transformation des Plasmides pAgMET3p-CYK1-GFP-natMX3 in die *Agcyk1*-Mutante komplementiert bei einer Kultivierung des Stammes in 2xCSM ohne Methionin den Septierungsdefekt. In den Calcofluor gefärbten Hyphen (Ca) sind in regelmäßigen Abständen Septen zu beobachten und die Lokalisierung des Proteins durch GFP erfolgt an Stellen zukünftiger Septierung. Durch die Zugabe von 2mM Methionin erfolgt die Abschaltung des *AgMET3p* und der Mutante-Phänotyp von *Agcyk1* ist nach 4h Inkubation bei 30°C zu beobachten. Größenbalken 30µm.

Die Kultivierung des *A. gossypii* Wildtyps in 2xCSM-Flüssigmedium und die anschließende Färbung mit Calcofluor zeigt eine regelmäßige Septierung der Hyphen (Abbildung 30). Das Myzel der *Agcyk1*-Mutante ist nicht septiert. Durch eine Calcofluor-Färbung konnte ausschließlich das Chitin der Zellwand sichtbar gemacht werden. Das Wachstum des Stammes ADA17 in 2xCSM ohne Methionin führt zu einer regelmäßigen Septierung des Myzels. Die Expression von *AgCYK1* durch den *AgMET3p* komplementiert den Septierungsdefekt der *Agcyk1*-Mutante. Die Lokalisierung von Cyk1-GFP erfolgt als einzelner Ring an zukünftigen Septierungsstellen. Durch die Zugabe von 2mM Methionin wird der *AgMET3p* reprimiert und eine Lokalisierung von Cyk1-GFP ist nicht mehr möglich. Der für die Septierung benötigte Aktinring wird nicht ausgebildet, was unseptierte Hyphen in Stamm ADA20 zur Folge hat.

4.3.5. Regulierbare Expression von *AgWAL1* durch den *ScMET3p*

Untersuchungen des *WAL1*-Gens in *A. gossypii* haben gezeigt, dass dieses Gen Funktionen bei der Aufrechterhaltung des polarisierten Hyphenwachstums besitzt. Die Deletion von *AgWAL1* resultiert in einem verlangsamten Wachstum und Defekten beim polarisierten Wachstum, was zu einem Anschwellen von subapikalen Hyphenabschnitten führt (WALTHER and WENDLAND, 2004).

Für die funktionelle Analyse des *ScMET3*-Promotors in *A. gossypii* wurde das *AgWAL1*-Gen ausgewählt. Der endogene Promotor des *AgWAL1*-ORFs auf dem Plasmid pRS415 *AgWAL1* wurde durch ein *GEN3*-*ScMET3p*-Fragment, welches mit den Primer S1-MET3p-*AgWAL1* und S2-*ScMET3p*-*AgWAL1* von pFA-*GEN3*-*ScMET3p* amplifiziert wurde, ausgetauscht. Die vorhandenen Homologieregionen der Primer ermöglichten eine genaue Integration des PCR-Fragments durch eine *in vivo*-Rekombination in *S. cerevisiae*. Nachfolgend wurde der *GEN3*-Marker durch eine *Bam*HI-Restriktion aus dem pRS415 *ScMET3p*-*AgWAL1*-*GEN3* entfernt und durch ein *Bgl*II geschnittenes NATMX3-Fragment ersetzt. Der entstandene Expressionsvektor pRS415 *ScMET3p*-*AgWAL1*-NATMX3 wurde in die *Agwall1*-Mutante transformiert, wodurch der Stamm ADA12 entstand.

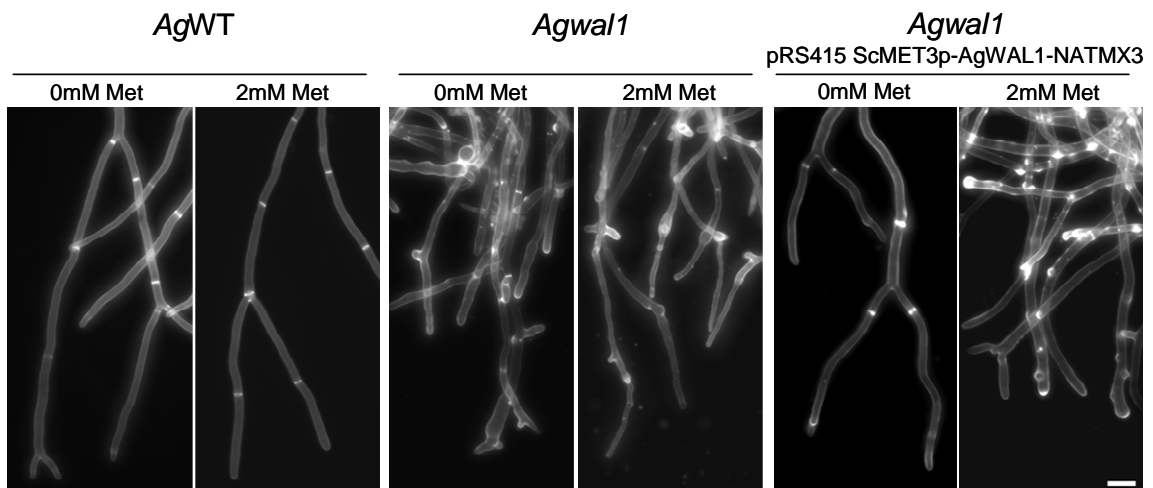


Abbildung 31: Regulierbare Expression von *ScMET3p-AgWAL1* in der *Agwal1*-Mutante

Die Komplementierung der *Agwal1*-Mutante durch den Vektor pRS415 *ScMET3p-AgWAL1-NATMX3* wird durch Wachstum des Stammes in 2xCSM ohne Methionin erreicht. Die Calcofluor gefärbten Hyphen zeigen ein polarisiertes Wachstum und eine Wildtyp-ähnliche Septierung. Nach Zugabe von 2mM Methionin zeigt dieser Stamm geschwollene Hyphen, die in kürzeren Abständen verzweigt sind und einen Septierungsdefekt aufweisen. Größenbalken 20µm.

Für die Überprüfung der Regulierbarkeit des *ScMET3p* in *A. gossypii* wurde der Stamm ADA12 in 2xCSM mit und ohne Methionin bei 30°C kultiviert. Das Wachstum dieses Stammes ohne Methionin führt zu einer Komplementierung des *Agwal1*-Defektes (Abbildung 31). Anhand einer Calcofluor-Färbung sind die in regelmäßigen Intervallen gebildeten Septen zu sehen. Durch das Fehlen von Methionin ist eine Expression von *AgWAL1* möglich, was zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führt. Wird jedoch 2mM Methionin zur Kultur gegeben, so erfolgt eine Reprimierung des durch den *ScMET3p* kontrollierten ORF. Die Hyphen sind dicker, in kürzeren Abständen verzweigt und es ist eine fehlerhafte Septierung zu beobachten. Das gefärbte Chitin der Septen ist nicht immer gleichmäßig über den Hyphendurchmesser verteilt, sondern häuft sich an einer Stelle der Zellwand. Der beobachtete Phänotyp entspricht dem der *Agwal1*-Mutante. Neben dem *AgMET3p*, ist also auch die Verwendung des heterologen *ScMET3p* für die gezielte Expression von ausgewählten Genen in *A. gossypii* möglich.

4.3.6. *AgCBF1* komplementiert die Methionin-Auxotrophie einer *Sccbf1*-Mutante

Die Expression und Regulation des *MET3*-Promotors in *S. cerevisiae* ist abhängig von der Bindung des Cbf1. Eine *Sccbf1*-Mutante zeichnet sich phänotypisch durch Defekte bei der Chromosomenverteilung in der Mitose und Meiose aus und besitzt eine Methionin-Auxotrophie (CAI und DAVIS, 1990). Die Identifizierung von Cbf1-Bindestellen im *MET3*p von *A. gossypii* weist auf eine Regulation dieses Promotors durch das AgCbf1 hin. Um eine Funktionshomologie des ScCbf1 und AgCbf1 bezüglich der Regulation von *MET3*-Promotoren zu überprüfen, sollte die Kompletierung der Methionin-Auxotrophie einer *Sccbf1*-Mutante durch das *AgCBF1* gezeigt werden.

Der ORF- und Terminatorbereich des *AgCBF1* wurde mit den Primern atg-AgCBF1-XhoI und 3'AgCBF1-BglII von genomischer DNA amplifiziert. Das 1193bp große Fragment und pRS AgMET3p-lacZ wurden mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BglII* geschnitten und das AgCBF1-Fragment anstelle des *lacZ*-Gens in den linearisierten Vektor integriert. Nachfolgend wurde der *kan*-ORF des *GEN3*-Markers des entstandenen Plasmids pRS AgMET3p-AgCBF1 durch den *NAT*-ORF ersetzt. Dazu wurde der *NAT*-ORF mit den Primern S1-NATvskan und S2-NATvskan amplifiziert und durch eine *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* anstelle des *kan*-ORFs eingebaut. Der neu entstandene Marker, flankiert durch den *ScTEF1*-Promotor und *ScTEF1*-Terminator, wurde als *NATMX5* bezeichnet. Für die Steuerung der Expression von *AgCBF1* wurde der *ScGAL1*-Promotor in pRS NATMX5 AgMET3p-AgCBF1 integriert. Nach Linearisierung von pRS NATMX5 AgMET3p-AgCBF1 mit *KpnI* und *XhoI* wurde ein durch PCR mit den Primern 5'ScGAL1p-KpnI und 3'ScGAL1p-XhoI generiertes ScGAL1p-Fragment hinein ligiert.

Mit der Transformation von pRS NATMX5 ScGAL1p-AgCBF1 in den haploiden *Sccbf1*-Deletionstamm Y16858 sollte die Komplementierung der Methionin-Auxotrophie einer *cbf1*-Mutante überprüft werden. Zu Kontrollzwecken wurde pRS NATMX5 in den Y16858 Stamm und in dessen Ausgangsstamm BY4742 transformiert. Das Leerplasmid pRS NATMX5 ist durch eine Restriktion mit *PvuII* von

pRS NATMX5 ScGAL1p-AgCBF1 entstanden, bei dem durch Religation der ScGAL1p und AgCBF1-ORF entfernt wurde.

Die *Sccbf1*-Mutante ist wie beschrieben nicht in der Lage unter Abwesenheit der Aminosäure Methionin zu wachsen (Abbildung 32). Die Kultivierung der *cbf1*-Mutante mit dem pRS NATMX5 ScGAL1p-AgCBF1 Plasmid auf Galaktose-haltigem Medium ohne Methionin führt zu einem Wachstum dieses Stammes. Die Verwendung von Galaktose als Kohlenstoffquelle sichert die Expression des *AgCBF1* durch den *ScGAL1p*. Auf Glucose-haltigem Medium ist der Promotor abgeschaltet und der Hefestamm ist nicht in der Lage, zu wachsen. Mit dem *CBF1*-Gen aus *A. gossypii* ist eine Komplementierung der Methionin-Auxotrophie in *Sccbf1*-Mutanten möglich. Der Kontrollstamm mit dem *ScCBF1*-Gen ist unter allen gewählten Bedingungen zum Wachstum fähig.

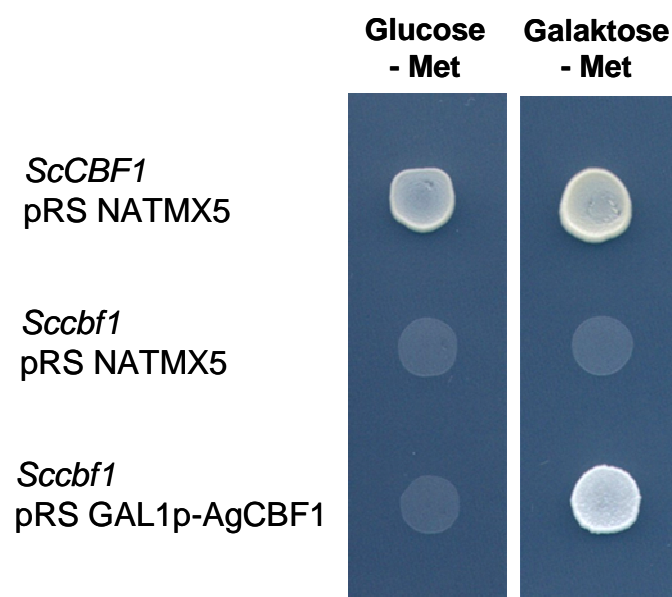


Abbildung 32: Komplementierung der Methionin-Auxotrophie einer *Sccbf1*-Mutante durch *AgCBF1*

Die Plasmide pRS NATMX5 und pRS NATMX5 ScGAL1p-AgCBF1 wurden in die *Sccbf1*-Mutante (Y16858) transformiert. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm der *cbf1*-Mutante BY4742. Die Transformation von pRS NATMX5 ermöglicht diesem Stamm das Wachstum auf Medien, die das Antibiotikum clonNAT enthalten. Die dargestellten Stämme wurden für 3 Tage bei 30°C auf Minimalmedien inkubiert. Auf Galaktose-haltigem Medium wird *AgCBF1* exprimiert und ist in der Lage die Methionin-Auxotrophie einer *Sccbf1*-Mutante zu komplementieren.

5. DISKUSSION

5.1. Die GTPasen Rho3 und Rho4 sind in *C. albicans* am polarisierten Wachstum und an der Zytokinese beteiligt

C. albicans ist ein humanpathogener Pilz mit unterschiedlichen morphologischen Wachstumsformen, die durch Reaktionen auf externe Umweltsignale beeinflusst sind. Die Pathogenität von *C. albicans* ist eng mit dem Wachstum in der Hyphenform verbunden (LO et al., 1997). GTP-Bindeproteine sind in allen eukaryotischen Zellen zu finden und haben regulatorische Funktionen. Diese GTPasen sind maßgeblich an der Steuerung des polarisierten Wachstums beteiligt und haben bei verschiedenen Pilzspezies Einfluss auf die Morphogenese der Hyphen (WENDLAND und PHILIPPSEN, 2001; WANG et al., 2003; BASSILANA et al., 2005; MAHLERT et al., 2006). In *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass Ras1 als zentraler Regulator der Morphogenese agiert und über die cAMP- und MAPK-Signalkaskade Transkriptionsfaktoren aktiviert, die für die Hyphenbildung verantwortlich sind (LEBERER et al., 2001). Nach der Deletion von *RAS1* in *C. albicans*, verbleiben die Zellen dieser Mutante in der Hefephase unter den verschiedensten Hypheninduktionsbedingungen. Im Gegensatz dazu führt die Expression eines dominant aktiven *RAS1* Allels (*ras1*^{G13V}) zu einer konstitutiven Hyphenbildung (FENG et al., 1999). Die RhoGTPase Cdc42 lokalisiert an die Hyphen- und Knospenspitze, aber auch an Septierungsstellen. Cdc42 ist an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt und begleitet Funktionen während des polarisierten Wachstums (USHINSKY et al., 2002; VAN DEN BERG et al. 2004). In dieser Arbeit wurde die Funktion von Rho3 und Rho4 in *C. albicans* untersucht. Beide Proteine konnten aufgrund von Sequenzhomologien in den GTP/GDP-Bindedomänen und Effektordomänen eindeutig zur Familie der Rho-Typ GTPasen zugeordnet werden. Am C-Term besitzen sie ein CAAX-Sequenzmotiv, das die Bindung der GTPase an die Membran vermittelt.

5.1.1. CaRho3 hat Funktionen bei der Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums

Nach Abschaltung des durch den *MET3p* kontrollierten *RHO3*-Allels zeigen die Zellen in der Hefe- und Hyphenphase einen Defekt im polarisierten Wachstum. Nach Induktion des Hyphenwachstums durch Serum kommt es zu einer Anschwellung der Hyphenspitzen, was ähnlich zum Phänotyp einer *rho3*-Mutante in *A. gossypii* ist. Ein *Agrho3*-Stamm zeigt in regelmäßigen Abständen eine Depolarisierung des Aktins, das wie bei *Carho3*-Mutanten in einem Anschwellen der Hyphenspitze resultiert (WENDLAND und PHILIPPSEN, 2001). Außerdem hat AgRho3 Funktionen während der Sporenkeimung bei 37°C, da in der Mutante unter diesen Bedingungen eine Lyse der gekeimten Sporen beobachtet wurde. Das Anschwellen der Hyphenspitzen in *C. albicans* steht im direkten Verhältnis zur Depolarisierung des Aktins. Nach der Depolarisierung des Aktins kann eine erneute Polarisierung erfolgen und das gerichtete Wachstum durch die Hyphe wird wieder aufgenommen. Morphologisch hat dieses Ereignis eine Verdickung in der ansonsten schlank gewachsenen Hyphe zur Folge. Der beobachtete Phänotyp in der Hefephase, ist vergleichbar mit dem in *S. cerevisiae*. Die Disruption von *RHO3* hat in beiden Organismen einen Verlust der Zellpolarität zur Folge (MATSUI und TOH-E, 1992).

5.1.2. Ras1 induziertes Hyphenwachstum benötigt die GTPase Rho3

Für *S. cerevisiae* und *A. gossypii* konnte in 2-Hybrid-Experimenten gezeigt werden, dass ScRho3 und AgRho3 mit dem Bni1-Homologen des jeweiligen Organismus interagiert (DONG et al., 2003; KNECHTLE et al., 2006). Eine *bni1*-Mutante in *C. albicans* zeigt vielfältige Defekte, unter anderem auch beim polarisierten Hyphenwachstum (MARTIN et al., 2005; LI et al., 2005). CaBni1 liegt in einer Signalkaskade, die durch die Ras1 GTPase reguliert wird (MARTIN et al., 2005). Die Defekte der *bni1*-Mutante im polarisierten Hyphenwachstum konnten durch die Expression eines dominant-aktiven *RAS1* Allels nicht kompensiert werden (Martin et al., 2005). Die Deletion von *RHO3* führt, ähnlich wie bei *bni*-Mutanten, zu einer Blockierung des polarisierten Wachstums. Die Expression von konstitutiv aktivem *RAS1* im *rho3/MET3p-RHO3*-Stamm, nach Abschalten des *MET3p*,

konnte die Defekte in der Hyphenbildung nicht kompensieren. Das Ras1 induzierte Hyphenwachstum von *C. albicans* benötigt demzufolge die RhoGTPase Rho3 für die Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums. Die Rolle beim Spitzenwachstum und die Ras1-Experimente deuten darauf hin, dass in *C. albicans* Rho3 und das Formin Bni1 in einer gemeinsamen Kaskade agieren.

Die GTPasen Ras1, Cdc42 und Rho3 nehmen sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in *C. albicans* zentrale Rollen bei der Steuerung lebensnotwendiger Wachstumsprozesse ein. Ras1 hat dabei eine übergeordnete Funktion. Die RhoGTPasen Cdc42 und Rho3 sind im Speziellen an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität involviert, die durch die Aktivierung des Formins Bni1 erreicht wird. In *S. cerevisiae* wurde die Interaktion beider RhoGTPasen mit der G-Protein-Bindedomäne von Bni1 nachgewiesen (EVANGELISTA et al., 1997). Die Herstellung von *RHO3* und *CDC42* Nullmutanten in *C. albicans* ist nicht möglich. Diese Tatsache unterstreicht die essentielle Funktion dieser beiden GTPasen für das Wachstum in der Zelle (PARK und MORSCHHÄUSER, 2005). CaCdc42 lokalisiert an die Spitze der Wachstumszone in Hefe- und Hyphenphase und in den Bereichen der Septierung (USHINSKY et al., 2002; HAZAN und LIU, 2002). Dieses Lokalisierungsmuster deckt sich mit dem von Bni1, was eine Aktivierung von Bni1 durch Cdc42 auch in *C. albicans* nahe legt (LI et al., 2005). Alle Versuche zur Lokalisierung von Rho3 durch eine N-terminale GFP-Fusion waren erfolglos, wie auch in den verwandten Ascomyceten *S. cerevisiae* und *A. gossypii*. Dabei wäre die Lokalisierung entscheidend für eine weiterführende Untersuchung und Einordnung der Rho3-Funktion gewesen. Eine andere Möglichkeit zur Überprüfung der Interaktion zwischen Bni1 und den RhoGTPasen wäre in einem 2-Hybrid-System gegeben.

5.1.3. Rho4 hat in *C. albicans* Funktionen bei der Zytokinese

Homologe zum CaRho4 wurden in verschiedenen Pilzspezies identifiziert. *C. albicans* gehört zusammen mit *S. cerevisiae* und *A. gossypii* zu den Hemiascomyceten. Die Deletion der *RHO4*-Homologen in *S. cerevisiae* und *A. gossypii* hat keine Veränderungen in der Morphologie oder im Wachstum zur Folge (MATSUI und TOH-E, 1992; WENDLAND et al., 2000). In *S. pombe* lokalisiert Rho4 an das Septum und hat dort Funktionen bei der

Aktinpolarisierung. Eine Überexpression dieses Rho-Proteins hat Lyse und morphologische Defekte zur Folge. Sowohl bei der Deletion, als auch der Überexpression von *RHO4* in *S. pombe* wurden Zellwanddefekte beobachtet (SANTOS et al., 2003). Die Untersuchung von Rho4 in *N. crassa* haben gezeigt, dass diese GTPase auch in einem filamentösen Pilz an der Septierung beteiligt ist. NrRho4 hat Funktionen bei der Bildung des Aktinringes während der Septierung, was bei einer Deletion von *RHO4* ein septenloses Myzel zur Folge hat. Die Expression eines dominant-aktiven *RHO4*-Allels dagegen resultiert in einer gehäuften Septierung des Myzels in kurzer Folge (RASMUSSEN und GLASS, 2005). In *S. pombe* hat neben Rho4 auch Rho3 Einfluss auf die Septierung und sowohl *rho4*-Zellen, als auch *rho3*-Zellen zeigen einen Zytokinesedefekt (SANTOS et al., 2003; WANG et al., 2003). Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung und Deletion von *RHO4* in *C. albicans* legt eine Beteiligung an der Septierung nahe. Die Hefezellen der *Carho4*-Mutante wachsen in langen Zellketten, die sich verzweigen können. Das zwischen Mutter und Tochterzellen ausgebildete Septum wird normalerweise nach erfolgreicher Mitose durch Chitinasen teilweise abgebaut, so dass eine Zelltrennung stattfinden kann. In den *rho4*-Zellen erfolgt dieser letzte Schritt der Zytokinese nicht und hat ein kettenartiges Wachstum der Hefezellen zur Folge. Das Wachstum der Hyphen wird durch eine *RHO4*-Deletion nicht beeinflusst. Der Zytokinesedefekt von *rho4*-Zellen in *S. pombe* ist auf eine Inhibierung der Glucanase-Aktivität von Eng1 und Agn1 beim Abbau des Septums zurückzuführen. Für die Deletion der β -1,3 Endoglucanase Eng1 in *C. albicans* wurde ein ähnlicher Phänotyp wie für *rho4*-Mutanten beschrieben. Dieser Stamm hat einen Zytokinesedefekt, der zu einem kettenartigen Wachstum der Hefezellen führt (ESTEBAN et al., 2005). Die Überexpression dieser Endoglucanase in *C. albicans* durch den konstitutiv-aktiven *AgTEF1*-Promotor in einer *rho4*-Mutante, hebt den Zelltrennungsdefekt auf. Eine regulatorische Funktion von Rho4 auf Glucanasen beim Abbau von Glucan am Septum zum Zwecke der Zelltrennung scheint damit im Hemiascomyceten *C. albicans* und Archiascomyceten *S. pombe* konserviert zu sein. Neben Eng1 ist auch die Chitinase Cht3 an der Hydrolyse von Zellwandkomponenten am Septum bei der Zytokinese beteiligt (DÜNKLER et al., 2005). Die Überexpression von *CHT3* in der *rho4*-Mutante kann das kettenartige Wachstum jedoch nicht supprimieren.

Der zelluläre Phänotyp von *Carho4*-Mutanten geht mit einer gefurchten Koloniemorphologie auf Vollmedium einher. Diese Verbindung zwischen Zytokinesedefekt und Koloniemorphologie ist auch bei anderen Mutanten, wie *Caace2*, *Cacht3* oder *Caeng1* beschrieben worden (KELLY et al., 2004; DÜNKLER et al., 2005; ESTEBAN et al., 2005). Für die Disruption von *CHT3* und *RHO4* konnte gezeigt werden, dass die gefurchte Koloniemorphologie nicht durchgängig bei allen Mutanten zu beobachten ist, sondern in Abhängigkeit mit der Generationszeit der Stämme steht. Mutanten mit einer runzeligen Oberfläche enthielten das *URA3*-Gen, zeigten die Kolonien eine glatte Morphologie, fehlte *URA3*. Die Wahl der Selektionsmarker hat einen Einfluss auf die Generationszeit der Stämme. Die *rho4*- und *cht3*-Mutanten mit dem *URA3*-Gen haben eine kürzere Generationszeit und produzieren annähernd so viele Zellen in einer bestimmten Zeit wie der Wildtyp. Das zeigt, dass eine schnellere Generationszeit in Verbindung mit einem Zytokinesedefekt unter optimalen Wachstumsbedingungen, zu einer gefurchten Koloniemorphologie führt. Durch das Wachstum auf Minimalmedium oder bei 20°C erhöht sich die Generationszeit und alle Mutanten zeigen eine glatte Koloniemorphologie. Mittels Zeitraffer-Mikroskopie konnte gezeigt werden, wie sich die Hefezellen des Wildtyps nach der Zytokinese trennen, durch Bildung immer neuer Tochterzellen gegenseitig verschieben und dicht aneinander liegen. Die Ähnlichkeit der runzeligen Oberflächenstruktur von *rho4*-Mutanten mit der Koloniemorphologie von Stämmen auf Hyphen-induzierendem Medium bei 37°C, geht auf ein ähnliches Wachstumsmuster zurück. Beim Hyphenwachstum werden septierte Filamente gebildet, die sich nicht separieren.

Ähnliche Beobachtungen hat man in *S. cerevisiae* gemacht. Es wurden *S. cerevisiae* Wildtyp-Stämme isoliert, die eine flockige Oberflächenstruktur zeigten. Die im Labor verwendeten Stämme haben jedoch eine glatte Koloniemorphologie (KUTHAN et al., 2003). Bei den isolierten Stämmen konnte man zeigen, dass die runzelige Koloniemorphologie durch sich nicht vollständig trennenden Hefezellen, die monopolar knospen, verursacht wird.

5.1.4. CaRho4 hat zwei voneinander unabhängige Funktionen

Neben dem Zytokinesedefekt von *rho4*-Mutanten haben deren Hefenzellen zusätzlich eine elongierte Form, die sich von der ellipsoiden Gestalt des Wildtyps unterscheidet. Diese veränderte Zellmorphologie steht nicht in Abhängigkeit zum Zytokinesedefekt. Durch die Überexpression von *ENG1* kann der Zelltrennungsdefekt aufgehoben werden, die elongierte Gestalt der Hefen bleibt jedoch erhalten. Das deutet darauf hin, dass CaRho4 zwei voneinander unabhängige Funktionen hat. Durch die Expression von *GFP-RHO4* konnte sowohl der Zytokinesedefekt, als auch die elongierte Hefeform der *rho4*-Mutanten komplementiert werden.

Eine Überexpression von *RHO3* ist nicht in der Lage den Zytokinesedefekt und die elongierte Gestalt der Hefezellen einer *rho4*-Mutante zu supprimieren. Rho3 und Rho4 haben in *C. albicans* unterschiedliche zelluläre Funktionen. Dagegen wurde in *S. cerevisiae* gezeigt, dass eine *ScRHO4* Überexpression die Wachstumsdefekte einer *Scrho3*-Mutante aufheben kann und beide GTPasen überlappende Funktionen besitzen (MATSUI und TOH-E, 1992).

5.1.5. CaRho4 und CaBnr1 lokalisieren an Septierungsstellen

CaRho4 lokalisiert in der Hefe- und Hyphenphase an Septierungsstellen. Das durch den *CaMAL2p* exprimierte *GFP-RHO4* führte in längeren und bereits mehrfach septierten Filamenten zu einer durchgehenden Lokalisierung von Rho4 an allen Septierungsstellen. In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die persistente Lokalisierung auch unter Kontrolle des endogenen *CaRHO4p* gegeben ist oder nur ein Effekt der konstitutiven Expression durch den *MAL2p* ist. Neben der regulierenden Funktion an den Septen, könnte Rho4 bei einer permanenten Lokalisierung in Filamenten eine weitere Funktion bei der Ausbildung von seitlichen Verzweigungen haben. In *C. albicans* entstehen Seitenhyphen ausschließlich an Septierungsstellen.

Die Deletion des an der Aktinkabelsynthese beteiligte Formins Bnr1 führt in der Hefephase zu einer elongierten Zellmorphologie, die vergleichbar mit der von *rho4*-Zellen ist (MARTIN et al., 2005). Zusätzlich lokalisiert auch Bnr1 an das Septum, in der Hefe- und

Hyphenphase. Die phänotypischen Gemeinsamkeiten der Deletionsmutanten und die sich deckenden Lokalisierungsmuster weisen auf die Funktion in einer gemeinsamen Kaskade hin. Rho4 wäre ein potentieller Aktivator für Bnr1. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass zwei unabhängige Mechanismen zu einem ähnlichen Ergebnis führen.

Eine elongierte Zellmorphologie wurde bei verschiedenen Mutanten in *S. cerevisiae* und *C. albicans* beobachtet. Drei Prozesse können zur Zellelongation führen: (i) eine Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums an der Spitze von Zellen durch eine anhaltende Cyclin-Aktivität (BENSEN et al., 2005), (ii) die verzögerte Kernverteilung während der Mitose wie beispielsweise in Dynein-Mutanten beobachtet (MARTIN et al., 2004) und (iii) die Beibehaltung der Polarisierung des Aktinzytoskeletts an der Zellspitze bei einer konstitutiven Aktivierung des Cdc42-Rho-Protein Komplexes (GULLI et al., 2000). Die Ergebnisse der Untersuchungen von CaRho4 und CaBnr1 lassen die (iv) Hypothese zu, dass in Abwesenheit eines Transportsystems, welches die Zellpolarität hin zu den Septierungstellen umleitet, ebenfalls zu Zellelongation führt. Rho4 wäre ein geeignetes Protein für die Etablierung der Aktinkabelsynthese an Septierungstellen im Anschluss an das Spitzenwachstum. In Abwesenheit von Rho4 könnte dieser Prozess von anderen RhoGTPasen und Bni1 übernommen werden, die ebenfalls an Septierungstellen lokalisieren. Eine Verzögerung dieses Mechanismus könnte zu einem anhaltenden Spitzenwachstum führen, was eine elongierte Zellmorphologie zur Folge hat. Das in Abbildung 33 gezeigte Modell basiert auf der Grundlage, dass polarisiertes Wachstum von der Zellspitze hin zu Septierungsstellen umgeleitet wird und dadurch Septierung und Zytokinese erfolgen kann. Rho4 kommt dabei eine Funktion bei der Aufhebung der etablierten Polarisierung an der Zellspitze zu. Dieses Modell wird durch die Lokalisierung von CaRho4 an Septierungsstellen nach dem Auskeimen von Tochterzellen unterstützt. Während der filamentösen Wachstumsphase wurde Rho4 ebenfalls an Septierungsstellen beobachtet, was darauf hindeutet, dass ein ähnlicher Mechanismus in Hyphen existieren könnte. Die Distanz zwischen Zellspitze und Septum ist in Hyphen größer als in Hefezellen, was den beiden Systemen erlauben könnte zur selben Zeit zu agieren, ohne das Set an Proteinen für die Etablierung der Zellpolarität an der Spitze. In weiteren Arbeiten muss der zeitliche Verlauf der Lokalisierung von CaRho4 geklärt werden und dessen Rolle bei der Septierung näher erforscht werden.

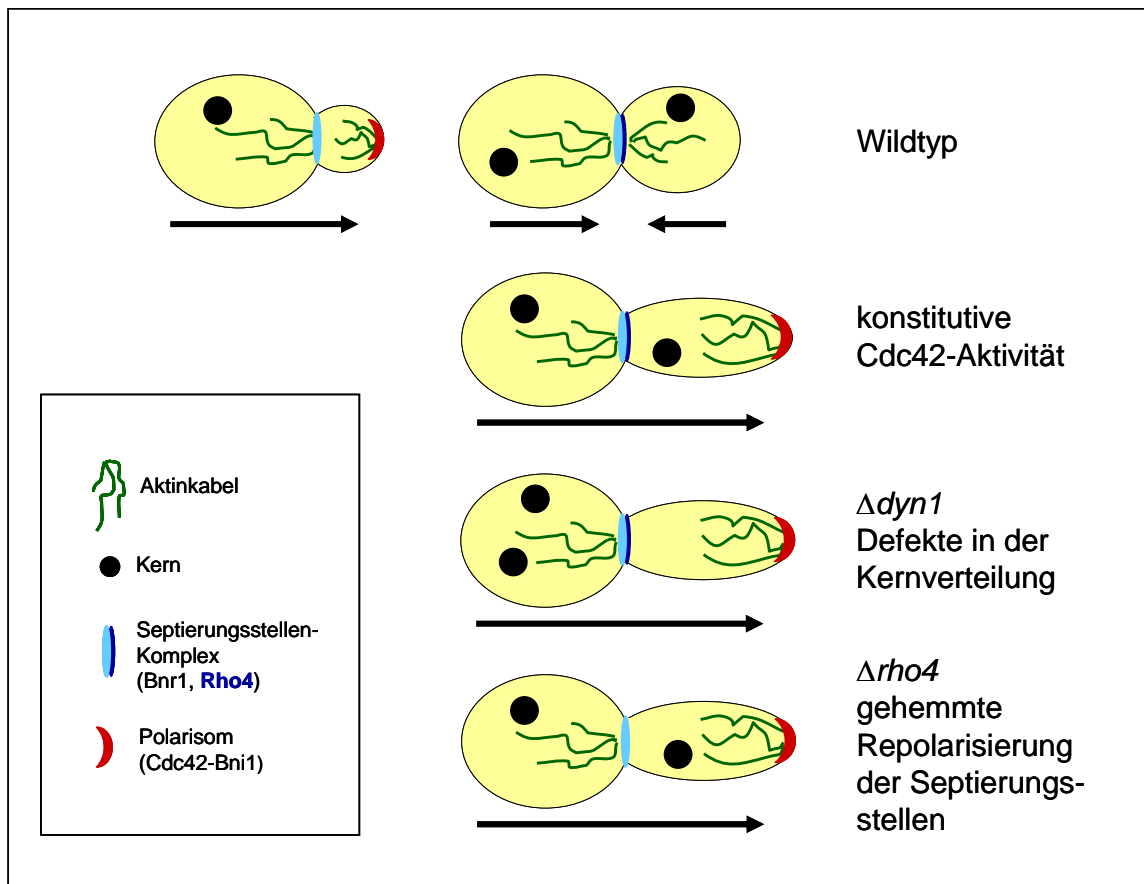


Abbildung 33: Modell regulatorischer Elemente, die das polarisierten Zellwachstums beeinflussen

In den Zellen des Wildtyps reguliert der Zellzyklus die Umschaltung vom polarisierten Spitzenwachstum hin zum polarisierten Wachstum an Septierungsstellen. Die Phase des polarisierten Spitzenwachstums kann durch die Expression von G1-Cyclinen oder durch die direkte Erhöhung der Cdc42-GTPase-Aktivität verlängert werden. Durch Defekte in der Kernverteilung verbleibt die Maschinerie im frühen Stadium des polarisierten Spitzenwachstums, das zu einem anhaltenden Wachstum an der Zellspitze in *dyn1*-Mutanten führt. Die Deletion von *RHO4* resultiert in einer Verzögerung der Repolarisierung des Wachstums hin zur Septierungsstelle.

5.2. AgCts2 - eine sporulations-spezifische Chitinase

Die Zellwand von Pilzen ist eine komplexe Struktur aus Chitin, Glucan und anderen Polysacchariden. Die Struktur der Zellwand ist hochdynamisch und unterliegt ständigen Veränderungen während der Zytokinese, Morphogenese und dem Wachstum. Die meisten hydrolytischen Enzyme, die mit der Zellwand assoziiert sind, haben Chitinase oder Glucanase-Aktivität (BALADRON et al., 2002; KURANDA und ROBBINS, 1991). In

C. albicans und *S. cerevisiae* wurden mehrere Chitinasen identifiziert. Hefen benötigen für die Vollendung ihres Zellzykluses Endochitinasen für den Abbau des Chitins am Septum zur vollständigen Trennung von Mutter- und Tochterzellen. In *A. gossypii* konnte lediglich eine Chitinase gefunden werden, die zur Familie 18 der glycosidischen Hydrolasen gehört (DIETRICH et al., 2004). Bei der Einzigen in Genom von *A. gossypii* identifizierten Chitinase AgCts2 handelt es sich aufgrund ihrer Domänenstruktur um eine sporulations-spezifische Hydrolase, die Sequenzähnlichkeiten mit dem ScCts2 und CaCht4 hat. Für das ausschließlich filamentöse Wachstum von *A. gossypii* scheint die Aktivität einer Endochitinase und deren Funktion bei der Zelltrennung nicht notwendig zu sein.

5.2.1. Cts2 ist am Aufbau der Sporenwand in *A. gossypii* beteiligt

Die Deletion von Cts2 in *A. gossypii* hat Auswirkungen auf die Sporenwandsynthese. Die Sporen einer *Agcts2*-Mutante unterscheiden sich in ihrer Oberflächenstruktur von den Sporen des Wildtyps. Die Oberflächen der *cts2*-Sporen erscheinen gröber und reliefartig strukturiert. Auf das nadelförmige Erscheinungsbild und die Größe der Sporen hat das Fehlen der Chitinase keinen Einfluss. Unterschiede in Wachstum und Morphologie der Myzelien wurden nicht festgestellt. Bei der Deletion der sporulations-spezifischen Chitinasen in *S. cerevisiae* und *C. albicans* konnten ebenfalls keinerlei Effekte auf das vegetative Wachstum beobachtet werden (GIAVER et al., 2002; DÜNKLER et al., 2005). Ähnlich wie in *A. gossypii* wurde für ScCts2 eine Beteiligung am Reifungsprozess der Ascosporen beschrieben. Expressionsstudien mit dem *AgCTS2*-Promotor haben gezeigt, dass eine Transkription ausschließlich in älteren, sporogenen Bereichen von Myzelien erfolgt. Eine Beteiligung von Cts2 an vegetativen Wachstumsprozessen kann aufgrund dessen ausgeschlossen werden.

Für das filamentöse Wachstum von *A. gossypii* ist das Vorhandensein einer Endochitinase möglicherweise nicht notwendig. Im Gegensatz dazu enthält das Genom des filamentösen Ascomyceten *A. fumigatus* 11 Chitinasen, die alle aufgrund ihrer konservierten Domänen zur Familie 18 glycosidischer Hydrolasen gehören. Die Deletion des Chitinasegens ChiA in *A. fumigatus*, welches Sequenzähnlichkeiten zur Endochitinase ScCts1 hat, führt zu einer Abnahme in der Frequenz der Sporenkeimung und zu einer niedrigeren Wachstumsrate.

Auf die Morphologie von Myzel und Sporen hat die Deletion keinen Einfluss (TAKAYA et al., 1998). Eine generelle Aussage über die Notwendigkeit von Endochitinasen für das filamentöse Wachstum von Ascomyceten ist daher nicht möglich.

Die Deletion der Endochitinasen Cts1 und Cht3 von *S. cerevisiae* und *C. albicans* hat im Gegensatz zur ChiA-Mutante in *A. fumigatus* keine Auswirkungen auf die Wachstumsraten. ScCts1 und CaCht3 haben ausschließlich Funktionen bei der Zytokinese von Hefezellen (KURANDA UND ROBBINS, 1991; DÜNKLER et al., 2005). Es ist zu vermuten, dass die zu den Hemiascomyceten gehörenden Vertreter *S. cerevisiae* und *C. albicans* für das vegetative Wachstum keine Chitinase-Aktivität benötigen. Für *A. fumigatus*, der zur Ordnung der Eurotiales zählt, ist die Aktivität einer Chitinase für vegetatives Wachstum notwendig. *A. gossypii*, gehört zu den Hemiascomyceten, vollzieht jedoch aufgrund seines filamentösen Wachstums keine Zytokinese, was die Funktion einer Endochitinase in diesem Organismus überflüssig machen könnte.

5.2.2. Die Cts2-Homologen haben konservierte Funktionen in verschiedenen Ascomyceten

Die Ascomyceten *A. gossypii* und *C. albicans* besitzen Homologe zur sporulations-spezifische Chitinase Cts2 von *S. cerevisiae*. Diese Homologen unterscheiden sich durch ihre Domänenstruktur von den in *S. cerevisiae* und *C. albicans* vorkommenden Endo- und Exochitinasen. Die hohe Sequenzidentität zwischen AgCts2, ScCts2 und CaCht4 gab erste Hinweise auf eine Funktionshomologie dieser sporulation-spezifischen Chitinasen. Mit der Reintegration des *AgCTS2*-Gens in die *Agcts2*-Mutante konnte bewiesen werden, dass die beobachteten Sporulationsdefekte durch die Deletion des *CTS2*-ORFs hervorgerufen wurden. Die Überexpression von *ScCTS2* und *CaCHT4* in der Mutante hatte ebenfalls eine Komplementierung der Defekte zur Folge. Die heterologe Expression der sporulations-spezifischen Chitinasen durch den *AgCTS2*-Promotor führt wie die Expression durch den *AgTEF1*-Promotor zur Bildung von Sporen mit einer glatten Oberfläche. Die Hydrolasen AgCts2, ScCts2 und CaCht4 sind Funktionshomologe, die am Aufbau der Sporenwand beteiligt sind. Demnach ist zu vermuten, dass der Aufbau der Sporenwand bei *C. albicans* dem der Ascosporen von *A. gossypii* und *S. cerevisiae* ähnlich ist. Die Funktionshomologie

der sporulation-spezifischen Chitinasen weist auf konservierte Prozesse bei der Synthese hin. Auch der Aufbau der Zellwand innerhalb der Ascomyceten ist strukturell gesehen sehr ähnlich und unterscheidet sich meist nur in den unterschiedlichen Anteilen der Komponenten (ADAMS, 2004). Durch die komplette Genomsequenzierung von *C. albicans* konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die Sequenzhomologien zu Genen von *S. cerevisiae* besitzen, die ausschließlich Funktionen während der Sporulation haben. Die Deletion von beispielsweise *AMA1*, *SSP2*, *SPO73* oder *SPO75* in *S. cerevisiae* resultiert in Sporulationsdefekten (ENYENIHI und SAUNDERS, 2003). In *C. albicans* existiert zu jedem dieser Gene ein Sequenzhomolog. Neben den erwähnten Genen besitzt *C. albicans* weitere Sequenzhomologe zu Sporulationsgenen in *S. cerevisiae*. Ein Nachweis sexueller Sporen in *C. albicans* fehlt bisher, die Anlagen dafür sind jedoch vorhanden. Neben dem Wachstum in der Hefe- und Hyphenform, bildet *C. albicans* unter semiaeroben Bedingungen Chlamydosporen aus, deren Funktion bisher ungeklärt ist. Die Deletion des Funktionshomologs von *AgCTS2*, *CaCHT4* hat keine Auswirkungen auf die Bildung und Morphologie der dickwandigen Chlamydosporen. Die Komplementierung der *Agcts2*-Mutante durch *CaCht4* zeigt die Funktionalität dieses Enzyms und weist auf eine Funktion bei der Wandsynthese von sexuellen Sporen hin.

5.3. Regulierbare Expression durch den *AgMET3*-Promotor in *A. gossypii*

Durch die Fusion des *AgMET3p* mit verschiedenen Reportergenen konnte gezeigt werden, dass eine Regulation dieses Promotors aus *A. gossypii* durch Methionin möglich ist. Die Kultivierung von *A. gossypii* in Minimalmedium ohne die schwefelhaltige Aminosäure, gewährleistet eine konstitutive Expression des nachfolgenden ORFs. Mit der Zugabe von 2mM Methionin kommt es zu einer Reprimierung des Promotors. Die gemessenen Intensitäten des GFPs, das mit dem *AgMET3p* fusioniert wurde, erreichten nach 5h die Werte des Kontrollstammes. In den Verwandten Ascomyceten *S. cerevisiae* und *C. albicans* ist die Verwendung des *MET3p* ein häufig genutztes Werkzeug zur Funktionsanalyse von Genen (MOUNTAIN et al., 1991; STARK, 1998; CARE et al., 1999).

Für die Etablierung des *AgMET3p* zur Untersuchung von Deletionsmutanten in *A. gossypii* wurde die *Agcyk1*-Mutante mit einem *AgMET3p-AgCYK1-GFP*-Konstrukt komplementiert. Es konnte gezeigt werden, dass unter reprimierenden Bedingungen der septenlose Phänotyp der *cyk1*-Mutante erhalten bleibt. In Abwesenheit von Methionin, was eine Expression durch den *AgMET3p* sicherstellt, konnte Cyk1 lokalisiert und die Ausbildung von Septen beobachtet werden. Damit steht in *A. gossypii* für verschiedenste Untersuchungen ein regulierbarer Promotor zur Verfügung.

5.3.1. Der *AgMET3p* in *S. cerevisiae*

Die Untersuchungen zur Regulation des *AgMET3p* in *S. cerevisiae* zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Bei Abwesenheit von Methionin war eine konstitutive Transkription des nachfolgenden ORFs in allen Fällen gewährleistet. Durch die Fusion dieses Promotors mit GFP konnte gezeigt werden, dass eine Abschaltung in *S. cerevisiae* über einige Stunden möglich ist, da die gemessenen Intensitäten nach 10h ähnlich dem des *ScMET3p* waren. Die Abschaltung des fusionierten *lacZ*-Gens durch den *AgMET3p* über einen längeren Zeitraum auf Festmedium konnte jedoch nicht erreicht werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse in der Regulation der verwendeten Reportergene könnten in der unterschiedlichen Inkubationszeit der Teststämme begründet liegen. Die Detektion der Blaufärbung der *S. cerevisiae*-Stämme mit dem *lacZ*-Gen erfolgte nach 3 Tagen, während der GFP-Intensität über wenige Stunden gemessen wurde. Ein weiterer Grund könnte in der hohen Enzymstabilität der β -Galaktosidase im Gegensatz zum GFP liegen. Der *AgMET3p* scheint in *S. cerevisiae*, im Gegensatz zum *ScMET3p*, eine erhöhte Durchlässigkeit aufzuweisen.

Die Regulation des *ScMET3p* ist sowohl in *S. cerevisiae*, als auch in *A. gossypii* möglich. Mit einem durch den *ScMET3p* kontrollierten *AgWAL1*-ORF konnte die *Agwal1*-Mutante komplementiert und unter reprimierenden Bedingungen der Mutante-Phänotyp dargestellt werden. Der Promotor des *MET3*-Gens aus *S. cerevisiae* ist eine funktionelle Alternative zum *AgMET3p* und kann ebenfalls für Abschaltungsexperimente in *A. gossypii* verwendet werden.

Für die Expression von *MET3* in *S. cerevisiae* ist die Bindung von Cbfl nötig (HIETER et al., 1985). Mit der Komplementierung der Methionin-Auxotrophie einer *Sccbfl*-Mutante durch den Zentromer-Bindefaktor von *A. gossypii* konnte gezeigt werden, dass AgCbfl ebenfalls Funktionen bei der Regulation der Methioninbiosynthese hat.

6. LITERATUR

6.1. Fachliteratur

- Adamo, J.E., J.J. Moskow, A.S. Gladfelter, D. Viterbo, D.J. Lew, and P.J. Brennwald. 2001. Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *J Cell Biol.* 155:581-92.
- Adamo, J.E., G. Rossi, and P. Brennwald. 1999. The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol Biol Cell.* 10:4121-33.
- Adams, A.E., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat, and J.R. Pringle. 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 111:131-42.
- Alberts, A.S. 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem.* 276:2824-30.
- Ashby, S.F., and Novell, W. 1926. The fungi of Stigmatomycosis. *Ann.Bot.* 40, 69-84.
- Baker, R.E., and D.C. Masison. 1990. Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* centromere-binding protein CP1. *Mol Cell Biol.* 10:2458-67.
- Baladron, V., S. Ufano, E. Duenas, A.B. Martin-Cuadrado, F. del Rey, and C.R. Vazquez de Aldana. 2002. Eng1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 1:774-86.
- Bassilana, M., J. Hopkins, and R.A. Arkowitz. 2005. Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell.* 4:588-603.
- Bensen, E.S., A. Clemente-Blanco, K.R. Finley, J. Correa-Bordes, and J. Berman. 2005. The mitotic cyclins Clb2p and Clb4p affect morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 16:3387-3400.
- Bhat, P.J., D. Oh, and J.E. Hopper. 1990. Analysis of the GAL3 signal transduction pathway activating GAL4 protein-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 125:281-91.
- Bi, E., J.B. Chiavetta, H. Chen, G.C. Chen, C.S. Chan, and J.R. Pringle. 2000. Identification of novel, evolutionarily conserved Cdc42p-interacting proteins and of redundant pathways linking Cdc24p and Cdc42p to actin polarization in yeast. *Mol Biol Cell.* 11:773-93.
- Black, S., P.D. Andrews, A.A. Sneddon, and M.J. Stark. 1995. A regulated MET3-GLC7 gene fusion provides evidence of a mitotic role for *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 1. *Yeast.* 11:747-59.
- Blaiseau, P.L., and D. Thomas. 1998. Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA. *Embo J.* 17:6327-36.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349:117-27.
- Brakhage, A.A. 1998. Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:547-85.

- Braun, B.R., M. van Het Hoog, C. d'Enfert, M. Martchenko, J. Dungan, A. Kuo, D.O. Inglis, M.A. Uhl, H. Hogues, M. Berriman, M. Lorenz, A. Levitin, U. Oberholzer, C. Bachewich, D. Marcus, A. Marcil, D. Dignard, T. Iouk, R. Zito, L. Frangeul, F. Tekaiia, K. Rutherford, E. Wang, C.A. Munro, S. Bates, N.A. Gow, L.L. Hoyer, G. Kohler, J. Morschhauser, G. Newport, S. Znaidi, M. Raymond, B. Turcotte, G. Sherlock, M. Costanzo, J. Ihmels, J. Berman, D. Sanglard, N. Agabian, A.P. Mitchell, A.D. Johnson, M. Whiteway, and A. Nantel. 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* 1:36-57.
- Briza, P., M. Eckerstorfer, and M. Breitenbach. 1994. The sporulation-specific enzymes encoded by the DIT1 and DIT2 genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4524-8.
- Briza, P., A. Ellinger, G. Winkler, and M. Breitenbach. 1988. Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol Chem.* 263:11569-74.
- Briza, P., H. Kalchhauser, E. Pittenauer, G. Allmaier, and M. Breitenbach. 1996. N,N'-Bisformyl dityrosine is an in vivo precursor of the yeast ascospore wall. *Eur J Biochem.* 239:124-31.
- Broek, D., N. Samiy, O. Fasano, A. Fujiyama, F. Tamanoi, J. Northup, and M. Wigler. 1985. Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell.* 41:763-9.
- Buffo, J., M.A. Herman, and D.R. Soll. 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 85:21-30.
- Cabib, E., J. Drgonova, and T. Drgon. 1998. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem.* 67:307-33.
- Cabib, E., D.H. Roh, M. Schmidt, L.B. Crotti, and A. Varma. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* 276:19679-82.
- Cai, M., and R.W. Davis. 1990. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell.* 61:437-46.
- Care, R.S., J. Trevethick, K.M. Binley, and P.E. Sudbery. 1999. The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol.* 34:792-8.
- Cherest, H., N.T. Nguyen, and Y. Surdin-Kerjan. 1985. Transcriptional regulation of the MET3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 34:269-81.
- Christodoulidou, A., V. Bouriotis, and G. Thireos. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 271:31420-5.
- Christodoulidou, A., P. Briza, A. Ellinger, and V. Bouriotis. 1999. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Lett.* 460:275-9.
- Cid, V.J., A. Duran, F. del Rey, M.P. Snyder, C. Nombela, and M. Sanchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 59:345-86.
- Colman-Lerner, A., T.E. Chin, and R. Brent. 2001. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell.* 107:739-50.

- Correa, J.U., N. Elango, I. Polacheck, and E. Cabib. 1982. Endochitinase, a mannan-associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 257:1392-7.
- Crampin, H., K. Finley, M. Gerami-Nejad, H. Court, C. Gale, J. Berman, and P. Sudbery. 2005. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci.* 118:2935-47.
- De Groot, P.W., K.J. Hellingwerf, and F.M. Klis. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast.* 20:781-96.
- Delley, P.A., and M.N. Hall. 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol.* 147:163-74.
- Demain, A.L. 1972. Riboflavin oversynthesis. *Annu Rev Microbiol.* 26:369-88.
- Dijkgraaf, G.J.; Li, H and H.Bussey. 2002. Cell wall glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In A.Steinbuchel(ed.), Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Dietrich, F.S., S. Voegeli, S. Brachat, A. Lerch, K. Gates, S. Steiner, C. Mohr, R. Pohlmann, P. Luedi, S. Choi, R.A. Wing, A. Flavier, T.D. Gaffney, and P. Philippsen. 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science.* 304:304-7.
- Dong, Y., D. Pruyne, and A. Bretscher. 2003. Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol.* 161:1081-92.
- Doolin, M.T., A.L. Johnson, L.H. Johnston, and G. Butler. 2001. Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol.* 40:422-32.
- Enyenihi, A.H., and W.S. Saunders. 2003. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163:47-54.
- Esteban, P.F., I. Rios, R. Garcia, E. Duenas, J. Pla, M. Sanchez, C.R. de Aldana, and F. Del Rey. 2005. Characterization of the CaENG1 gene encoding an endo-1,3-beta-glucanase involved in cell separation in *Candida albicans*. *Curr Microbiol.* 51:385-92.
- Evangelista, M., K. Blundell, M.S. Longtine, C.J. Chow, N. Adames, J.R. Pringle, M. Peter, and C. Boone. 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science.* 276:118-22.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol.* 4:260-9.
- Feng, Q., E. Summers, B. Guo, and G. Fink. 1999. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 181:6339-46.
- Finley, R.L., Jr., and R. Brent. 1994. Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12980-4.
- Fonzi, W.A., and M.Y. Irwin. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* 134:717-28.
- Fuller, K.J., M.A. Morse, J.H. White, S.J. Dowell, and M.J. Sims. 1998. Development of a yeast trihybrid screen using stable yeast strains and regulated protein expression. *Biotechniques.* 25:85-8, 90-2.
- Gale, C.A., C.M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J.M. Becker, J. Berman, and M.K. Hostetter. 1998. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science.* 279:1355-8.

- Geber, A., P.R. Williamson, J.H. Rex, E.C. Sweeney, and J.E. Bennett. 1992. Cloning and characterization of a *Candida albicans* maltase gene involved in sucrose utilization. *J Bacteriol.* 174:6992-6.
- Giaever, G., A.M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A.P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D.J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J.H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D.F. Jaramillo, D.E. Kelly, S.L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D.C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S.L. Ooi, J.L. Revuelta, C.J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D.D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, J.N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volekaert, C.Y. Wang, T.R. Ward, J. Wilhelmy, E.A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J.D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R.W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 418:387-91.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, and R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 11:355-60.
- Gillum, A.M., E.Y. Tsay, and D.R. Kirsch. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet.* 198:179-82.
- Gladfelter, A.S., I. Bose, T.R. Zyla, E.S. Bardes, and D.J. Lew. 2002. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J Cell Biol.* 156:315-26.
- Glomset, J.A., and C.C. Farnsworth. 1994. Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol.* 10:181-205.
- Gooday, G.W. 1995. Cell walls. In the growing Fungus. Seite 43-62. Edited by Gow, N.A. and Gadd, G.M. London: Chapman and Hall.
- Gow, N.A., A.J. Brown, and F.C. Odds. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 5:366-71.
- Gow, N.A., and G.W. Gooday. 1982. Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 128:2187-94.
- Gulli, M.P., M. Jaquenoud, Y. Shimada, G. Niederhauser, P. Wiget, and M. Peter. 2000. Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Celll.* 6:1155-67.
- Guo, W., F. Tamanoi, and P. Novick. 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol.* 3:353-60.
- Hausauer, D.L., M. Gerami-Nejad, C. Kistler-Anderson, and C.A. Gale. 2005. Hyphal guidance and invasive growth in *Candida albicans* require the Ras-like GTPase Rsr1p and its GTPase-activating protein Bud2p. *Eukaryot Cell.* 4:1273-86.
- Hazan, I., and H. Liu. 2002. Hyphal tip-associated localization of Cdc42 is F-actin dependent in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 1:856-64.
- Heath, I.B., and G. Steinberg. 1999. Mechanisms of hyphal tip growth: tube dwelling amebae revisited. *Fungal Genet Biol.* 28:79-93.

- Hennemuth, B., and K.A. Marx. 2006. DNA deformability changes of single base pair mutants within CDE binding sites in *S. Cerevisiae* centromere DNA correlate with measured chromosomal loss rates and CDE binding site symmetries. *BMC Mol Biol.* 7:12.
- Hieter, P., D. Pridmore, J.H. Hegemann, M. Thomas, R.W. Davis, and P. Philippsen. 1985. Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell.* 42:913-21.
- Hoffman, C.S., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57:267-72.
- Holly, S.P., and K.J. Blumer. 1999. PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 147:845-56.
- Hube, B., and J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147:1997-2005.
- Hull, C.M., and A.D. Johnson. 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science.* 285:1271-5.
- Hull, C.M., R.M. Raisner, and A.D. Johnson. 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 289:307-10.
- Imai, J., A. Toh-e, and Y. Matsui. 1996. Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RHO3 gene, encoding a rho-type small GTPase, provides evidence for a role in bud formation. *Genetics.* 142:359-69.
- Imamura, H., K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, T. Kamei, K. Takahashi, T. Sasaki, and Y. Takai. 1997. Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 16:2745-55.
- Ish-Horowicz, D., and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-98.
- Johnson, D.I. 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:54-105.
- Kapteyn, J.C., H. Van Den Ende, and F.M. Klis. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta.* 1426:373-83.
- Kataoka, T., S. Powers, C. McGill, O. Fasano, J. Strathern, J. Broach, and M. Wigler. 1984. Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell.* 37:437-45.
- Keller, P.J., Q. Le Van, S.U. Kim, D.H. Bown, H.C. Chen, A. Kohnle, A. Bacher, and H.G. Floss. 1988. Biosynthesis of riboflavin: mechanism of formation of the ribitylamino linkage. *Biochemistry.* 27:1117-20.
- Kelly, M.T., D.M. MacCallum, S.D. Clancy, F.C. Odds, A.J. Brown, and G. Butler. 2004. The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol.* 53:969-83.
- Klis, F.M., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 26:239-56.
- Knechtle, P., J. Wendland, and P. Philippsen. 2006. The SH3/PH domain protein AgBoi1/2 collaborates with the Rho-type GTPase AgRho3 to prevent nonpolar growth at hyphal tips of *Ashbya gossypii*. *Eukaryot Cell.* 5:1635-47.

- Kohler, G.A., T.C. White, and N. Agabian. 1997. Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol.* 179:2331-8.
- Kohno, H., K. Tanaka, A. Mino, M. Umikawa, H. Imamura, T. Fujiwara, Y. Fujita, K. Hotta, H. Qadota, T. Watanabe, Y. Ohya, and Y. Takai. 1996. Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 15:6060-8.
- Kollar, R., E. Petrakova, G. Ashwell, P.W. Robbins, and E. Cabib. 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *J Biol Chem.* 270:1170-8.
- Kollar, R., B.B. Reinhold, E. Petrakova, H.J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J.C. Kapteyn, F.M. Klis, and E. Cabib. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem.* 272:17762-75.
- Kreger-Van Rij, N.J. 1978. Electron microscopy of germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 117:73-7.
- Kreger-Van Rij, N.J. 1984. The yeast, a taxonomy study. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V.
- Krammer, K.J., and D. Koga 1986. Insect chitin: Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.* 16:851-877.
- Kuranda, M.J., and P.W. Robbins. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 266:19758-67.
- Kuras, L., H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan, and D. Thomas. 1996. A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism. *Embo J.* 15:2519-29.
- Kuthan, M., F. Devaux, B. Janderova, I. Slaninova, C. Jacq, and Z. Palkova. 2003. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol.* 47:745-54.
- Leberer, E., D. H Marcus, D. Dignard, L. Johnson, S. Ushinsky, D.Y. Thomas, and K. Schroppel. 2001. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 42:673-87.
- Lenburg, M.E., and E.K. O'Shea. 1996. Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci.* 21:383-7.
- Lew, D.J., and S.I. Reed. 1995. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J Cell Biol.* 129:739-49.
- Li, C.R., Y.M. Wang, X. De Zheng, H.Y. Liang, J.C. Tang, and Y. Wang. 2005. The formin family protein CaBni1p has a role in cell polarity control during both yeast and hyphal growth in *Candida albicans*. *J Cell Sci.* 118:2637-48.
- Liu, H., J. Kohler, and G.R. Fink. 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science.* 266:1723-6.
- Lo, H.J., J.R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loeberberg, A. Cacciapuoti, and G.R. Fink. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 90:939-49.

- Lockhart, S.R., R. Zhao, K.J. Daniels, and D.R. Soll. 2003. Alpha-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryot Cell*. 2:847-55.
- Madden, K., and M. Snyder. 1998. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol*. 52:687-744.
- Magee, B.B., and P.T. Magee. 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*. 289:310-3.
- Magnelli, P., J.F. Cipollo, and C. Abeijon. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. *Anal Biochem*. 301:136-50.
- Mahlert, M., L. Leveleki, A. Hlubek, B. Sandrock, and M. Bolker. 2006. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*. 59:567-78.
- Marcoux, N., S. Cloutier, E. Zakrzewska, P.M. Charest, Y. Bourbonnais, and D. Pallotta. 2000. Suppression of the profilin-deficient phenotype by the RHO2 signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 156:579-92.
- Martin, R., A. Walther, and J. Wendland. 2005. Ras1-induced hyphal development in *Candida albicans* requires the formin Bni1. *Eukaryot Cell*. 4:1712-24.
- Martin, R., A. Walther, and J. Wendland. 2004. Deletion of the dynein heavy chain gene DYN1 leads to aberrant nuclear positioning and defective hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 3:1574-88.
- Marzluf, G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu Rev Microbiol*. 51:73-96.
- Matsui, Y., and E.A. Toh. 1992. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Mol Cell Biol*. 12:5690-9.
- Mellor, J., W. Jiang, M. Funk, J. Rathjen, C.A. Barnes, T. Hinz, J.H. Hegemann, and P. Philippsen. 1990. CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *Embo J*. 9:4017-26.
- Mishra, C., C.E. Semino, K.J. McCreath, H. de la Vega, B.J. Jones, C.A. Specht, and P.W. Robbins. 1997. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13:327-36.
- Mountain, H.A., A.S. Bystrom, J.T. Larsen, and C. Korch. 1991. Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 7:781-803.
- Mrsa, V., T. Seidl, M. Gentzsch, and W. Tanner. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13:1145-54.
- Nakano, K., T. Mutoh, R. Arai, and I. Mabuchi. 2003. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells*. 8:357-70.
- Nguyen, M.H., J.E. Peacock, Jr., A.J. Morris, D.C. Tanner, M.L. Nguyen, D.R. Snyderman, M.M. Wagener, M.G. Rinaldi, and V.L. Yu. 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med*. 100:617-23.
- Odds, F.C. 1988. *Candida and Candidosis*. London: Bailliere Tindal.

- Ozaki-Kuroda, K., Y. Yamamoto, H. Nohara, M. Kinoshita, T. Fujiwara, K. Irie, and Y. Takai. 2001. Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21:827-39.
- Pammer, M., P. Briza, A. Ellinger, T. Schuster, R. Stucka, H. Feldmann, and M. Breitenbach. 1992. DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast.* 8:1089-99.
- Park, Y.N., and J. Morschhauser. 2005. Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 4:1328-42.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 297:612-5.
- Pruyne, D., L. Gao, E. Bi, and A. Bretscher. 2004. Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 15:4971-89.
- Pujol, C., K.J. Daniels, S.R. Lockhart, T. Srikantha, J.B. Radke, J. Geiger, and D.R. Soll. 2004. The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate. *Eukaryot Cell.* 3:1015-27.
- Rasmussen, C.G., and N.L. Glass. 2005. A Rho-type GTPase, rho-4, is required for septation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 4:1913-25.
- Rustad, T.R., J.H. Choiniere, D.H. Howard, and T.C. White. 2006. The *Candida albicans* mating type like locus [MTL] is not involved in chlamydospore formation. *Med Mycol.* 44:677-81.
- Sagot, I., S.K. Klee, and D. Pellman. 2002a. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol.* 4:42-50.
- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002b. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol.* 4:626-31.
- Santos, B., J. Gutierrez, T.M. Calonge, and P. Perez. 2003. Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 2:521-33.
- Santos, M.A., and M.F. Tuite. 1995. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* 23:1481-6.
- Schmitz, H.P., S. Huppert, A. Lorberg, and J.J. Heinisch. 2002. Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J Cell Sci.* 115:3139-48.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Simon, M.N., C. De Virgilio, B. Souza, J.R. Pringle, A. Abo, and S.I. Reed. 1995. Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature.* 376:702-5.
- Sloat, B.F., and J.R. Pringle. 1978. A mutant of yeast defective in cellular morphogenesis. *Science.* 200:1171-3.
- Smits, G.J., H. van den Ende, and F.M. Klis. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology.* 147:781-94.
- Soll, D.R., R. Galask, J. Schmid, C. Hanna, K. Mac, and B. Morrow. 1991. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J Clin Microbiol.* 29:1702-10.

- Stahmann, K.P., H.N. Arst, Jr., H. Althofer, J.L. Revuelta, N. Monschau, C. Schlupen, C. Gatgens, A. Wiesenburg, and T. Schlosser. 2001. Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environ Microbiol.* 3:545-50.
- Stahmann, K.P., J.L. Revuelta, and H. Seulberger. 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53:509-16.
- Stark, M.J.R. 1998. Studying essential genes: Generating and using promoters fusions and conditional alleles. *Methods Microbiolog.* 26: 83-99
- Steinmetz, H.T. 1999. Mykosen. Candidainfektionen in der Intensivmedizin. *Ausgabe 1*. PVV-Verlag
- Stoldt, V.R., A. Sonneborn, C.E. Leuker, and J.F. Ernst. 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J.* 16:1982-91.
- Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81:153-208.
- Takaya, N., D. Yamazaki, H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi. 1998. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62:60-5.
- Thomas, D., H. Cherest, and Y. Surdin-Kerjan. 1989. Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. *Mol Cell Biol.* 9:3292-8.
- Thomas, D., I. Jacquemin, and Y. Surdin-Kerjan. 1992. MET4, a leucine zipper protein, and centromere-binding factor 1 are both required for transcriptional activation of sulfur metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 12:1719-27.
- Thomas, D., and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:503-32.
- Timson, D.J., H.C. Ross, and R.J. Reece. 2002. Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry. *Biochem J.* 363:515-20.
- Tiraboschi, I.N., J.E. Bennett, C.A. Kauffman, J.H. Rex, C. Girmenia, J.D. Sobel, and F. Menichetti. 2000. Deep *Candida* infections in the neutropenic and non-neutropenic host: an ISHAM symposium. *Med Mycol.* 38 Suppl 1:199-204.
- Tzung, K.W., R.M. Williams, S. Scherer, N. Federspiel, T. Jones, N. Hansen, V. Bivolarevic, L. Huizar, C. Komp, R. Surzycki, R. Tamse, R.W. Davis, and N. Agabian. 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3249-53.
- Uhl, M.A., and A.D. Johnson. 2001. Development of *Streptococcus thermophilus* lacZ as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology.* 147:1189-95.
- Ushinsky, S.C., D. Marcus, J. Ash, D. Dignard, A. Marcil, J. Morchhauser, D.Y. Thomas, M. Whiteway, and E. Leberer. 2002. CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 1:95-104.
- Valencia, A., P. Chardin, A. Wittinghofer, and C. Sander. 1991. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry.* 30:4637-48.

- VandenBerg, A.L., A.S. Ibrahim, J.E. Edwards, Jr., K.A. Toenjes, and D.I. Johnson. 2004. Cdc42p GTPase regulates the budded-to-hyphal-form transition and expression of hypha-specific transcripts in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 3:724-34.
- Walther, A., and J. Wendland. 2003. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet*. 42:339-43.
- Walther, A., and J. Wendland. 2004. Apical localization of actin patches and vacuolar dynamics in *Ashbya gossypii* depend on the WASP homolog Wal1p. *J Cell Sci*. 117:4947-58.
- Wang, H., X. Tang, and M.K. Balasubramanian. 2003. Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 164:1323-31.
- Wasserman, S. 1998. FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol*. 8:111-5.
- Wendland, J. 2001. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol*. 34:63-82.
- Wendland, J., Y. Ayad-Durieux, P. Knechtle, C. Rebischung, and P. Philippsen. 2000. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene*. 242:381-91.
- Wendland, J., and P. Philippsen. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics*. 157:601-10.
- Wendland, J., and P. Philippsen. 2002. An IQGAP-related protein, encoded by AgCYK1, is required for septation in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Fungal Genet Biol*. 37:81-8.
- Wendland, J., and A. Walther. 2005. *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology. *Nat Rev Microbiol*. 3:421-9.
- Whiteway, M., D. Dignard, and D.Y. Thomas. 1992. Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:9410-4.
- Wilson, R.B., D. Davis, and A.P. Mitchell. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol*. 181:1868-74.
- Winter, D., A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and R. Li. 1997. The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol*. 7:519-29.
- Zhang, X., E. Bi, P. Novick, L. Du, K.G. Kozminski, J.H. Lipschutz, and W. Guo. 2001. Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem*. 276:46745-50.
- Ziman, M., D. Preuss, J. Mulholland, J.M. O'Brien, D. Botstein, and D.I. Johnson. 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Biol Cell*. 4:1307-16.

6.2. Eigene Literatur

- Dünkler, A., A. Walther, C.A. Specht, and J. Wendland. 2005. *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol.* 42(11):935-47.
- Dünkler, A., and J. Wendland. 2007. *Candida albicans* Rho-type GTPase encoding genes required for polarized cell growth and cell separation. *Eukaryot Cell.* (in Revision).
- Gola, S., R. Martin, A. Walther, A. Dünkler, and J. Wendland. 2003. New moduls for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast.* 20:1339-1347.
- Schaub, Y., A. Dünkler, A. Walther, and J. Wendland. 2006. New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J Basic Mikrobiol.* 46(5):416-29.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	Ashbya Full Medium
bp	base pair (Basenpaar)
CA	Calcofluor
CSM	Complete Supplement Medium
DIC	Differential Interference Contrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
GFP	Green Fluorescent Protein (Grünfluoreszierendes Protein)
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
SD	Synthetic Dextrose medium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
YPD	Yeast-extract Peptone Dextrose medium